

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER KONSEQUENZEN EINER  
DEREGULIERTEN CHLOROPHYLLSYNTHESE UND  
FUNKTIONELLE ANALYSE DES YCF54/LCAA-PROTEINS IN  
CYANOBAKTERIEN UND PFLANZEN**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Annabel Girke, geb. Salinas Hartwig

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Bernhard Grimm  
2. Prof. Thomas J. Buckhout, Ph.D.  
3. Prof. Dr. Annegret Wilde

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 2015



# Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	XI
TABELLENVERZEICHNIS .....	XIV
ZUSAMMENFASSUNG .....	XVI
ABSTRACT .....	XVIII
 <b>1 Einleitung .....</b>	 <b>1</b>
1.1 Die oxygene Photosynthese .....	1
1.2 Die Chlorophyllbiosynthese – ein Abschnitt des Tetrapyrrolstoffwechselweges .....	2
1.2.1 Die Synthese von 5-Aminolävulinsäure .....	3
1.2.2 Die Synthese von Protoporphyrin IX .....	4
1.2.3 Die Reaktionswege des Mg-Zweiges der Tetrapyrrolbiosynthese .....	6
1.3 Die Mg-Protoporphyrin-IX-monomethylester-Cyclase – ein Enzym der Chlorophyllbiosynthese .....	8
1.4 Regulation der Chlorophyll-Biosynthese .....	12
1.5 Das chloroplastidäre Genom .....	14
1.6 Kommunikation vom Chloroplasten zum Zellkern .....	16
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit .....	17
 <b>2 Material und Methoden .....</b>	 <b>19</b>
2.1 Material .....	19
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Antikörper .....	19
2.1.3 Plasmide .....	21
2.1.4 Enzyme .....	22
2.1.5 Synthetische Oligonukleotide .....	22
2.1.6 Kits und sonstige Materialien .....	23
2.1.6.1 Kits .....	23
2.1.6.2 Größenstandards .....	24
2.1.6.3 Sonstige Materialien .....	24
2.1.7 Technische Geräte .....	25
2.1.8 Datenbanken und Software .....	26

2.1.9	Biologisches Material .....	28
2.1.9.1	Mikroorganismen .....	28
2.1.9.2	Pflanzen .....	29
2.1.10	Medien .....	30
2.1.10.1	Medien und Lösungen zur Kultivierung von Bakterien .....	30
2.1.10.2	Medien und Lösungen zur Kultivierung von Pflanzen .....	31
2.1.10.3	Medienzusätze .....	32
2.2	Methoden .....	33
2.2.1	Allgemeine und physiologische Methoden .....	33
2.2.1.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
2.2.1.2	Kultivierung von <i>Synechocystis</i> .....	33
2.2.1.3	Kultivierung von Pflanzen .....	34
2.2.1.4	Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkultur .....	35
2.2.1.5	Spektrophotometrische Messungen von <i>Synechocystis</i> -Kulturen .....	35
2.2.1.6	77K Fluoreszenzemissionsspektroskopie ganzer Zellen von <i>Synechocystis</i> .....	35
2.2.1.7	Wachstumsanalyse von <i>Synechocystis</i> -Kulturen .....	36
2.2.1.8	Zellernte, Zellaufschluss und Fraktionierung von <i>Synechocystis</i> - Zellen .....	36
2.2.1.9	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes von <i>Synechocystis</i> .....	37
2.2.1.10	Bestimmung des Phycocyanin- und Allophycocyaningehaltes von <i>Synechocystis</i> .....	37
2.2.1.11	Bestimmung des Pigmentgehaltes von Pflanzen .....	38
2.2.1.12	Bestimmung der Porphyringehalte .....	39
2.2.1.13	Bestimmung des Protochlid- und Chlid-Gehaltes .....	40
2.2.1.14	Bestimmung des Gehaltes von nicht kovalent gebundenem Häm ...	41
2.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	41
2.2.2.1	Isolation von genomischer DNA aus <i>Synechocystis</i> .....	41
2.2.2.2	Isolation von genomischer DNA aus Pflanzen .....	42
2.2.2.3	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> nach alkalischer Lyse .....	42
2.2.2.4	Amplifikation von DNA-Fragmenten .....	42
2.2.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	43
2.2.2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	43
2.2.2.7	DNA-Gelelektrophorese .....	43
2.2.2.8	Konstruktion von Plasmidvektoren und Modifikation von Nukleinsäuren .....	44
2.2.2.9	Sequenzierung von DNA .....	45
2.2.2.10	Isolation von RNA aus <i>Synechocystis</i> .....	45



2.2.2.11	Isolation von RNA aus Pflanzen .....	46
2.2.2.12	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese .....	46
2.2.2.13	Synthese von cDNA mittels Reverser Transkription .....	46
2.2.2.14	Quantifizierung von Transkripten mittels semiquantitativer PCR...	47
2.2.2.15	Quantifizierung von Transkripten mittels quantitativer <i>Real-Time</i> -PCR .....	47
2.2.2.16	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und deren Transformation .....	48
2.2.2.17	Herstellung elektrisch kompetenter Agrobakterien und deren Transformation .....	49
2.2.2.18	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis</i> .....	50
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	50
2.2.3.1	Proteinextraktion aus Pflanzen.....	50
2.2.3.2	TCA-Fällung und Proteinbestimmung mit BCA .....	51
2.2.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford .....	51
2.2.3.4	DOC/TCA-Fällung und Proteinbestimmung nach Lowry .....	51
2.2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	52
2.2.3.6	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	53
2.2.3.7	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....	53
2.2.3.8	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot) und Immunodetektion .....	54
2.2.3.9	Tryptischer In-Gel-Proteinverdau für massenspektrometrische Analysen.....	55
2.2.3.10	Massenspektrometrische Analyse mittels LC-MS/MS .....	56
2.2.4	Methoden zur Überexpression rekombinanter Proteine .....	57
2.2.4.1	Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> .....	57
2.2.4.2	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E. coli</i> .....	58
2.2.4.3	<i>In-vitro</i> -Bindungsassay (6xHis-Pulldown) .....	59
2.2.5	Zellbiologische Methoden und Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	59
2.2.5.1	Herstellung von Pflanzenextrakten aus <i>Arabidopsis</i> und <i>Nicotiana tabacum</i> .....	59
2.2.5.2	Isolierung intakter Chloroplasten aus <i>Arabidopsis</i> .....	60
2.2.5.3	Bestimmung der ALA-Synthesekapazität.....	61
2.2.5.4	Bestimmung der Mg-Chelatase-Aktivität .....	62
2.2.5.5	Bestimmung der Fe-Chelatase-Aktivität.....	62
2.2.5.6	Bestimmung der Methyltransferase-Aktivität.....	63
2.2.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	63
2.2.7	Statistische Methoden.....	63

<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>65</b>
3.1 Untersuchungen zur induzierten Deaktivierung von zwei tetrapyrrolbiosyntheserelevanten Genen .....	65
3.2 Untersuchungen von photoautotrophen Zellsuspensionskulturen von <i>Arabidopsis</i> auf ihre Anwendbarkeit für Studien schneller Signalantworten.....	72
3.3 Untersuchungen zur Funktion von Ycf54 in <i>Synechocystis</i> .....	79
3.3.1 Phänotypische Charakterisierung der <i>ycf54</i> -Mutante .....	82
3.3.2 <i>ycf54</i> akkumuliert das Substrat der Cyclase .....	85
3.3.3 Einfluss der <i>ycf54</i> -Mutation auf die Tetrapyrrolbiosynthese .....	85
3.3.4 Ycf54-Überexpression und Komplementation der <i>ycf54</i> -Mutation .....	88
3.3.5 Identifizierung potenzieller Interaktionspartner von Ycf54 in <i>Synechocystis</i> ..	94
3.4 Untersuchungen zur Funktion von Ycf54-Homologen in höheren Pflanzen .....	97
3.4.1 Sequenzanalyse von <i>LCAA</i> und subzelluläre Lokalisation des Genproduktes. ....	97
3.4.2 Phänotypische und physiologische Charakterisierung der Tabak <i>LCAA</i> -Antisense-Pflanzen .....	101
3.4.3 <i>LCAA</i> ist essenziell für die Chlorophyllbiosynthese .....	104
3.4.4 Tageslängenabhängige Auswirkungen der <i>LCAA</i> -Defizienz .....	109
3.4.5 Stabile Überexpression des homologen YCF54-Proteins in höheren Pflanzen.....	114
3.4.6 Überexpression und Reinigung von rekombinantem AtLCAA zur Durchführung von Pulldown-Experimenten.....	119
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>123</b>
4.1 Das Wechselspiel zwischen zeitlich induzierbarer Deaktivierung von chlorophyllbiosyntheserelevanten Genen und tetrapyrrolvermittelter Signalgebung .....	123
4.2 Photoautotrophe Zellkulturen von <i>Arabidopsis</i> als ergänzendes experimentelles System.....	124
4.3 Erkenntnisse zu tetrapyrrolvermittelten retrograden Signalen .....	126
4.4 Phylogenetische Betrachtungen und die partielle knockdown-Mutation von <i>ycf54</i> weisen auf eine essenzielle Funktion von <i>LCAA</i> /Ycf54 in der Chlorophyllbiosynthese hin .....	128
4.5 Physikalische Interaktionen von <i>LCAA</i> /Ycf54 und CHL27/CycI untermauern eine Zugehörigkeit von <i>LCAA</i> /Ycf54 zur Cyclase-Reaktion.....	130
4.6 Der <i>LCAA</i> /Ycf54-Mangel wirkt sich auf die ALA-Synthese und die Akkumulation tetrapyrrolbiosyntheserelevanter Proteine aus.....	131

4.7 Die Überexpression von LCAA/Ycf54 führt nicht allein zu einer Kompensation des Cyclase-Defektes .....	134
4.8 Der LCAA-Mangel in höheren Pflanzen unterscheidet sich hinsichtlich der Feedback-Regulation auf die ALA-Synthese deutlich von der <i>ycf54</i> -Mutante und der <i>CHL27</i> -Antisense-Linie.....	136
4.9 Die potenzielle Funktion von LCAA - wegweisend für ein Modell zur Rolle von LCAA innerhalb der Tetrapyrrolbiosynthese höherer Pflanzen.....	137
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>141</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>161</b>
PUBLIKATIONSLISTE.....	XIX
DANKSAGUNG .....	XXI
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	XXII

## Abkürzungsverzeichnis

<i>A. bidest</i>	<i>Aqua bidest</i> , doppelt-destilliertes Wasser
AF	Acifluorfen
ALA	5-Aminolävulinsäure
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
<i>At, Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
A.U.	<i>arbitrary units</i> , beliebige Einheiten
$\beta$ -DM	<i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Chl	Chlorophyll
Chlid	Chlorophyllid
cTP	chloroplastidäres Transitpeptid
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	Desoxyribonuklease I, <i>EC 3.1.21.1</i>
DOC	Natriumdesoxycholat
DP	2,2'-Dipyridyl
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> , und andere
FDR	<i>false discovery rate</i> , Falschpositivrate
FeCh, Fe-Chelatase	Ferrochelatase, <i>EC 4.99.1.1</i>
FG	Frischgewicht
FLU	<i>Fluorescent</i>
FNR	Ferredoxin-NADP-Reduktase, <i>EC 1.18.1.2</i>
fw	<i>forward</i> , vorwärts
GAB	Gabaculin
GluTR	Glutamyl-tRNA-Reduktase, <i>EC 1.2.1.70</i>
GluTS	Glutamyl-tRNA-Synthase, <i>EC 6.3.5.7</i>

---

GSA	Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase oder Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase, <i>EC 5.4.3.8</i>
gun	<i>genome uncoupled</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) ethansulfonsäure
His	Histidin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-thio- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
kb	Kilobasen
LB	<i>lysogeny broth</i>
LHCB	<i>light harvesting complex binding protein</i>
MEN	MOPS-EDTA-Natrium-Acetat-Puffer
MgCh, Mg-Chelatase	Magnesiumchelatase, <i>EC 6.6.1.1</i>
MgProto	Magnesium-Protoporphyrin IX
MgProtoME	Magnesium-Protoporphyrin IX-Monomethylester
MOPS	3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Medium nach Murashige & Skoog (1962)
MW	<i>molecular weight</i> , molekulare Masse
NADPH	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
n.d.	nicht detektierbar
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
NTRC	NADPH-abhängige Thioredoxin-Reduktase C, <i>EC 1.8.1.9</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen (Gen)
PASK	photoautotrophe Zellsuspensionskultur
PC	Phycocyanin
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>protein data base</i> , Proteindatenbank
PhANG	Photosynthese-assoziierten nukleären Gene
PLP	Pyridoxalphosphat
PMP	Pyridoxaminphosphat
POR	NADPH-Protochlorophyllid <i>a</i> -Oxidoreduktase, <i>EC 1.3.1.33</i>
Protochlid	Protochlorophyllid <i>a</i>
ProtoIX	Protoporphyrin IX

PSM	<i>peptide spectrum match</i> , Peptid-Spektrum-Übereinstimmung
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
RNAse A	Ribonuklease A, <i>EC 3.1.27.5</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> , Na-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SQ	semi-quantitativ
Syn, <i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
Tricin	<i>N</i> -(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.D.	über der Detektionsgrenze
Vol	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
ycf	<i>hypothetical chloroplast open reading frame</i> , hypothetischer chloroplastidärer offener Leserahmen

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erster Abschnitt der Chlorophyllbiosynthese - Die Synthese von 5-Aminolävulinsäure über den C5-Weg. ....	3
Abbildung 2: Ausschnitt der Chlorophyllbiosynthese - Die Synthese von Protoporphyrin IX ausgehend von 5-Aminolävulinsäure. ....	5
Abbildung 3: Finaler Abschnitt der Chlorophyllbiosynthese - Die Synthese von Chlorophyll <i>a</i> im Mg-Zweig. ....	7
Abbildung 4: Reaktionsmechanismus der sauerstoffabhängigen (unten) und -unabhängigen (oben) MgProtoME-Cyclase. ....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung des binären Vektors pOpOff2(hyg) zur Generierung der transgenen <i>Arabidopsis</i> RNAi-Linien in Anlehnung an Wielopolska <i>et al.</i> (2005). ....	65
Abbildung 6: Nachweis zur induzierten Gendeaktivierung in den <i>CHLH</i> - und <i>CHL27</i> -RNAi-Linien der T <sub>1</sub> -Generation mittels semiquantitativer PCR. ....	66
Abbildung 7: Physiologische und genetische Analyse von <i>CHLH</i> -RNAi-Linien. ....	67
Abbildung 8: Repräsentative <i>CHLH</i> -RNAi-Linien. ....	69
Abbildung 9: Repräsentative <i>CHL27</i> -RNAi-Linien. ....	69
Abbildung 10: Vorbereitende Experimente für eine globale Transkriptanalyse. ....	71
Abbildung 11: Etablierung photoautotropher Zellsuspensionskulturen (PASK) von <i>Arabidopsis</i> als experimentelles System. ....	73
Abbildung 12: Semiquantitative Expressionsanalyse tetrapyrrolbiosyntheserelevanter Gene in ALA-gefütterten PASK unter verschiedenen Lichtbedingungen. ....	74
Abbildung 13: Vergleichende Analyse der Transkriptgehalte einer Auswahl an tetrapyrrol- und photosyntheserelevanter Gene mittels semiquantitativer PCR sowie der Gehalte von Porphyrinen und Chlorophyll in PASK, die allein oder in Kombination mit ALA und Gabaculin (GAB) gefüttert wurden. ....	75
Abbildung 14: Effekte einer Hämin- sowie MgProto- und/oder 2,2'-Dipyridyl-Behandlung auf die Expression tetrapyrrol- und photosyntheserelevanter Gene und den Chlorophyllgehalt in PASK. ....	76
Abbildung 15: Auswirkungen einer Acifluorfen-, Dipyridyl- und/oder Proto-Behandlung auf die Expression photosyntheserelevanter Gene und den Phänotyp der PASK. (A).....	78

Abbildung 16: Schematische Darstellung der Insertionsmutagenese des <i>ycf54</i> -Gens ( <i>slr1780</i> ) aus <i>Synechocystis</i> und Nachweis der Segregation. ....	80
Abbildung 17: Phylogenetischer Baum von Ycf54. ....	81
Abbildung 18: Wachstumsanalyse von Wildtyp-(WT-) und <i>ycf54</i> -Zellen im Zellkulturplatten-Assay sowie Anzucht in Flüssigkultur unter Schwachlichtbedingungen. ....	82
Abbildung 19: Phänotyp des <i>ycf54</i> -Knock-downs. ....	83
Abbildung 20: Graduelle Abnahme der Phycocyaningehalte nach Stickstoffmangelanzucht von Wildtyp- und <i>ycf54</i> -Kulturen. ....	84
Abbildung 21: Semi-quantitative Western-Blot-Analyse von Tetrapyrrolbiosynthese-Enzymen und Photosynthese-Proteinen in <i>Synechocystis ycf54</i> -Gesamtzellextrakten im Vergleich zum Wildtyp (WT). ....	86
Abbildung 22: Relative Aktivitäten für Schlüsselenzyme der Tetrapyrrolbiosynthese. ....	87
Abbildung 23: Absorptions- und 77K-Chlorophyllfluoreszenz-Emissionsspektren. ....	90
Abbildung 24: qPCR-Analysen zur Quantifizierung von Transkriptgehalten ausgewählter Gene, die an der Cyclase-Reaktion und der photosynthetischen Lichtreaktion beteiligt sind, von <i>Synechocystis</i> Wildtyp-(WT)-, <i>ycf54</i> - und <i>ycf54/FLAG-ycf54</i> -Zellen. ....	92
Abbildung 25: Semiquantitative Western-Blot-Analysen von <i>Synechocystis</i> Wildtyp-(WT)-, <i>ycf54</i> -, <i>ycf54/FLAG-ycf54</i> - und <i>WT/FLAG-ycf54</i> -Gesamtzellextrakten. ....	93
Abbildung 26: Synthese von 5-Aminolävulinsäure in Wildtyp-(WT)-, <i>ycf54</i> -, <i>ycf54/FLAG-ycf54</i> - und <i>WT/FLAG-ycf54</i> -Zellen. ....	94
Abbildung 27: Expression und Aufreinigung des rekombinant in <i>E. coli</i> exprimierten 6xHis-Ycf54-Proteins zur Durchführung von Pulldown-Experimenten. ....	95
Abbildung 28: Sequenzalignment zur Verdeutlichung der evolutiven Konservierung von LCAA in höheren Pflanzen, Moosen, eukaryotischen Algen und Cyanobakterien. ....	99
Abbildung 29: Überexpression und subzelluläre Lokalisation von AtLCAA-GFP. ....	100
Abbildung 30: Repräsentative Tabak LCAA-Antisense-Linien. ....	101
Abbildung 31: Pigmentgehalte von Tabak Wildtyp und den LCAA-Antisense-Linien. ....	102
Abbildung 32: Aktivitäten ausgewählter Enzyme der Tetrapyrrolbiosynthese. ....	105
Abbildung 33: Analyse der Abundanz wichtiger Proteine in den LCAA-Antisense-Linien mittels Immunodetektion. ....	106



---

Abbildung 34: qPCR-Analyse zur Quantifizierung von Transkriptakkumulationen von Genen, die in die Tetrapyrrolbiosynthese (obiges Diagramm) sowie die Photosynthese und das antioxidative System der Chloroplasten (unteres Diagramm) des Tabak Wildtyps und der <i>LCAA</i> -Antisense-Linien involviert sind. ....	108
Abbildung 35: Vergleich physiologischer Parameter und wichtiger Proteinabundanzen von Tabak Wildtyp (WT) und den <i>LCAA</i> -Antisense-Linien in Abhängigkeit unterschiedlicher Längen der Lichtphasen. ....	110
Abbildung 36: Vergleichende Expressionsanalyse ausgewählter Gene in <i>LCAA</i> -Antisense-Linien mittels qPCR in Abhängigkeit unterschiedlicher Längen der Lichtphasen. ....	112
Abbildung 37: Ausbildung großflächiger Nekrosen in den Blättern der Antisense-Linien <i>LCAA#3</i> und <i>LCAA#4</i> unter Langtagbedingungen nach vorhergehender Kurztagadaptation. ....	113
Abbildung 38: Repräsentative Cosuppressions- und Überexpressions-Linien von <i>Arabidopsis</i> nach AtLCAA-HA-Strep-Expression.....	115
Abbildung 39: Quantifizierung der Pigmentgehalte von <i>Arabidopsis</i> cosupprimierten und AtLCAA-HA-Strep-überexprimierenden Linien in Relation zum Wildtyp Col0 und drei Kontroll-Linien.....	116
Abbildung 40: Analyse der Cosuppressions- und Überexpressions-Linien von <i>Arabidopsis</i> nach AtLCAA-HA-Strep-Expression in Hinblick auf die Abundanz wichtiger Proteine und die Aktivität des ratenlimitierenden Schritts der Tetrapyrrolbiosynthese.....	118
Abbildung 41: Schematische Darstellung des Konstrukts zur Überexpression des N-terminal 6xHis-getaggten AtLCAA-Proteins in <i>E. coli</i> .....	119
Abbildung 42: Expression und Aufreinigung des rekombinant in <i>E. coli</i> exprimierten 6xHis-AtLCAA-Proteins zur Durchführung von Pulldown-Experimenten.....	120
Abbildung 43: Ein hypothetisches Modell zur Rolle von LCAA bei der Feedback-Regulation der ALA-Synthese innerhalb der Tetrapyrrolbiosynthese in Chloroplasten.....	138
Abbildung 44: Alignment der Aminosäuresequenzen der offenen Leseraster der drei identifizierten TCs (TC41423, TC46832 und TC70459) aus <i>Nicotiana tabacum</i> .....	161

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper .....	19
Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide.....	21
Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.....	22
Tabelle 4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits.....	23
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Größenstandards mit definierten Molekulargewichten. .....	24
Tabelle 6: Liste verwendeter Filter, Membranen und Säulen.....	24
Tabelle 7: Technische Laborgeräte die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen. ....	25
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Datenbanken und Software. ....	27
Tabelle 9: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> -Stämme .....	28
Tabelle 10: Medien und Lösungen zur Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	30
Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen zur Anzucht von <i>Synechocystis</i> .....	31
Tabelle 12: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer zur Anzucht von Pflanzen und phototrophen Zellsuspensionskulturen von <i>Arabidopsis</i> . ....	31
Tabelle 13: Häufig verwendete Medienzusätze.....	32
Tabelle 14: Gradient zur Trennung und Elution von Pigmenten mittels HPLC.....	38
Tabelle 15: Gradient zur Trennung und Elution von Zn-ProtoIX mittels HPLC .....	39
Tabelle 16: Gradient zur Trennung und Elution von Protochlid und Chlid mittels HPLC. ....	40
Tabelle 17: Gradient zur Trennung und Elution von nicht kovalent gebundenem Häm mittels HPLC.....	41
Tabelle 18: Zusammensetzung der am häufigsten verwendeten SDS-Polyacrylamidgele. ....	53
Tabelle 20: Quantifizierung der Porphyrin- und Mg-Porphyringehalte in PASK nach zweistündiger Behandlung mit dem Chlorophyllintermediat MgProto (20 µM) und/oder dem Hemmstoff 2,2'-Dipyridyl (DP; 2 mM). ....	77

Tabelle 21: Quantifizierung der Chlorophyllvorstufen- und Chlorophyllgehalte in PASK nach vierstündiger Behandlung mit den Tetrapyrrolbiosynthese-Inhibitoren Acifluorfen (AF; 200 $\mu\text{M}$ ) oder Dipyridyl (DP; 2 mM) und/oder dem Chlorophyllintermediat Proto (50 $\mu\text{M}$ ). 77	77
Tabelle 22: Tetrapyrrolintermediatgehalte von <i>Synechocystis</i> Wildtyp-(WT-) und <i>ycf54</i> -Flüssigkulturen in BG11-Medium unter Schwachlichtbedingungen. .... 85	85
Tabelle 23: Pigment- und Porphyringehalte von <i>Synechocystis</i> Wildtyp-(WT-), <i>ycf54</i> -, <i>ycf54</i> / <i>FLAG-ycf54</i> - und <i>WT/FLAG-ycf54</i> -Zellen unter Schwachlichtbedingungen (20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) in Ab- oder Anwesenheit von Kupfer im Wachstumsmedium..... 89	89
Tabelle 24: Identifizierte Proteine in Eluaten von 6xHis-Ycf54-Pulldown-Experimenten mittels LC-MS/MS und Datenbanksuche. .... 96	96
Tabelle 25: Quantifizierung von Chlorophyllvorstufengehalten von Tabak Wildtyp und vier <i>LCAA</i> -Antisense-Linien nach Fütterung mit 1 mM ALA für 24 h bei konstanter Belichtung von 30 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ und 22 °C..... 103	103
Tabelle 26: Quantifizierung von <i>steady-state</i> -Gehalten der Chlorophyllvorstufen von Tabak Wildtyp und vier <i>LCAA</i> -Antisense-Linien unter Langtagbedingungen. .... 104	104
Tabelle 27: <i>Steady-state</i> -Gehalte der Chlorophyllvorstufen von <i>Arabidopsis</i> Wildtyp, drei Kontroll-Linien und je drei cosupprimierten und AtLCAA-überexprimierenden Linien. .... 117	117
Tabelle 28: Identifizierte Proteine in Eluaten von 6xHis-AtLCAA-Pulldown-Experimenten mittels LC-MS/MS und Datenbanksuche. .... 122	122
Tabelle 29: Auflistung von Primern für allgemeine Klonierungen, Sequenzierungen und Test-PCRs..... 162	162
Tabelle 30: Auflistung der verwendeten qPCR-Primerpaare. .... 165	165
Tabelle 31: Auflistung von Primerpaaren für die semi-quantitative Transkriptanalyse von <i>Arabidopsis</i> -Genen. .... 168	168

## Zusammenfassung

Die Photosynthese ist der wichtigste Prozess aller biologischen und chemischen Vorgänge, da durch die Umwandlung von Sonnenenergie in chemische Energie das ganze Leben auf der Erde maßgeblich bestimmt wird. Die entscheidende Lichtabsorption erfolgt bei diesem Prozess durch das photosynthetische Pigment Chlorophyll. Die Biosynthese von Chlorophyll ist komplex und umfasst mehr als ein Dutzend enzymatische Schritte. Es ist nur allzu selbstverständlich, dass eine Deregulation der Chlorophyllsynthese globale Effekte auf die Zelle hat. Um diese Konsequenzen näher zu beleuchten, wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit chemisch induzierter Deaktivierung von zwei Chlorophyllbiosynthesegenen (*CHLH* bzw. *CHL27*) erzeugt sowie photoautotrophe Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana* hinsichtlich kurzzeitig induzierter Signalprozesse untersucht. Die Resultate verdeutlichen, dass durch Fehlregulationen innerhalb der Chlorophyllbiosynthese erzeugte reaktive Sauerstoffspezies die Transkriptionskontrolle kernkodierter Gene beeinflussen.

Die Untersuchung eines enzymatischen Schrittes der Chlorophyllbiosynthese trat in dieser Arbeit in den Hauptfokus: Die Bildung des fünften, isozyklischen Ringes im Chlorophyllmolekül. Diese Mehrschritt-Reaktion wird durch das bisher unzureichend erforschte Enzym Mg-Protoporphyrin-IX-monomethylester-Cyclase (Cyclase) katalysiert. Welche Proteine an der Reaktion beteiligt sind und welche regulatorische Einflüsse ausgeübt werden, ist noch ungewiss. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand von transgenen Cyanobakterien und Pflanzen das noch unbekannte Gen *ycf54*, das zur Gruppe der *hypothetical chloroplast open reading frames* (*ycf*) gehört, hinsichtlich seiner physiologischen Funktion in dem Cyclase-Enzymschritt analysiert werden. Die durchgeführten Experimente liefern neben der Untereinheit CHL27/CycI/Ycf59 Hinweise für eine zweite, essenzielle Untereinheit der Cyclase. Das Fehlen von Ycf54 in *Synechocystis* sp. PCC6803 bzw. des homologen LCAA-Proteins in *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* führt zu starken Akkumulationen an Mg-Protoporphyrin-IX-monomethylester und verringerten Chlorophyllgehalten. In diesen Mutanten ist zudem der Proteingehalt an Ycf59 bzw. CHL27 reduziert. Ein Mangel von Ycf54/LCAA beeinträchtigt daher die Funktionalität des Cyclase-Komplexes und scheint sich zudem interessanterweise auch auf die Stabilität photosynthetischer Antennenkomplexe auszuwirken. Mittels Pulldown-Assays konnte für *Arabidopsis thaliana* die direkte physikalische Interaktion zwischen LCAA und CHL27 bestätigt werden. Darüber hinaus sind erste Hinweise für die Ferredoxin-NADP-Reduktase als potenziellen

Interaktionspartner gezeigt. Vermutlich besteht ein Zusammenwirken des Cyclase-Komplexes mit dem Aufbau der Photosynthesekomplexe, wodurch eine regulatorische Balance der beiden Prozesse, der Chlorophyllbiosynthese und der Biogenese photosynthetischer Komplexe, ermöglicht wird.

## Abstract

Photosynthesis is arguably the most important process of known biological and chemical operations. Hereby, the conversion of light energy into chemical energy will be destined for all life on Earth. Light absorption during this process is carried out by the vital photosynthetic pigment chlorophyll. Synthesis of chlorophyll is a complex metabolic process and encompasses more than a dozen enzymatic reactions. It is self-evident that a deregulation of chlorophyll biosynthesis evokes global cellular impacts. To elucidate these consequences *Arabidopsis thaliana* plants with chemically inducible deactivation of two chlorophyll biosynthesis genes (*CHLH* and *CHL27*, respectively) were generated and photoautotrophic cell suspension cultures of *Arabidopsis thaliana* were used for short induced signal processes. The results illustrate that reactive oxygen species provoked by a deregulated chlorophyll synthesis affect the control of transcription of nuclear genes.

The investigation of one enzymatic step of chlorophyll biosynthesis was placed as main focus: The formation of the isocyclic ring of the chlorophyll molecule. This multi-stepped reaction is catalyzed by the Mg protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase (short: cyclase), an enzyme which is not fully investigated so far. Those proteins involved in the reaction and the regulatory impact have to be elucidated. Within this work the still unknown *hypothetical chloroplast open reading frame (ycf) ycf54* should be analyzed concerning its physiological function in the enzymatic step of the Cyclase using transgenic cyanobacteria and plants. In addition to the subunit CHL27/CycI/Ycf59 performed experiments provided evidence for a second essential subunit of the Cyclase. Lack of Ycf54 in *Synechocystis* sp. PCC6803 and the homologous LCAA protein in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*, respectively, leads to chlorophyll deficiency and a strong accumulation of Mg protoporphyrin monomethyl ester. In these mutants, also the contents of Ycf59 and CHL27, respectively, were reduced. A deficit of Ycf54/LCAA impairs the functionality of the cyclase complex and also might compromise the stability of photosynthetic antenna complexes. Using pull-down assays a direct physical interaction between LCAA and CHL27 could be confirmed. Additionally, first evidences for ferredoxin NADP reductase as a potential interaction partner was given. It is proposed that the cyclase complex interconnect with the assembly machinery of the photosynthetic complexes. This interrelation would allow a regulatory balance between the two processes, chlorophyll biosynthesis and biogenesis of the photosynthetic units.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die oxygene Photosynthese

Die Evolution der oxygenen Photosynthese von Cyanobakterien bzw. deren Vorfahren vor etwa 2,4 Milliarden Jahren ist eines der zentralen Ereignisse in der Entwicklung des Lebens auf der Erde (Falkowski, 2006). Bei diesem bedeutsamen biologischen Prozess wird die Energie des Sonnenlichtes verwertet und Wasser als universeller Elektronendonator genutzt, wobei Sauerstoff als Nebenprodukt freigesetzt wird. Im Verlauf von 2,3 Milliarden Jahren reicherte sich der atmosphärische Sauerstoff auf die heutige Konzentration von ~ 20 % an (Bekker *et al.*, 2004; Fuchs, 2006). Der dramatische Wechsel von der ursprünglich anaeroben zu einer aeroben Atmosphäre trug maßgeblich zur Innovation der Zellatmung und damit zur Entwicklung eines energieeffizienteren Metabolismus bei (Blankenship & Hartman, 1998). Die Evolution der eukaryotischen oxygenen Photosynthese infolge der Plastiden- bzw. primären Endosymbiose und der späteren sekundären Endosymbiose (Chan & Bhattacharya, 2010; Chan *et al.*, 2011; Hohmann-Marriott & Blankenship, 2011) ermöglichte letztlich die Entstehung komplexer, mehrzelliger, photoautotropher Organismen (Lane & Martin, 2010). Photoautotrophe Organismen sind in der Lage mithilfe von Sonnenlichtenergie aus Kohlenstoffdioxid und Wasser energiereiche organische Verbindungen, wie z. B. Glukose aufzubauen. Sie dienen als sogenannte Primärproduzenten in dieser Weise den heterotrophen Organismen als Energie- und Kohlenstoffquelle und bilden das Fundament des globalen Ökosystems. Durch photosynthetische Prozesse werden jährlich schätzungsweise über 100 Mrd. Tonnen an Biotrockenmasse produziert (Barber, 2009), was mehr als dem Zweihundertfachen des aktuellen Gewichts der Weltbevölkerung entspricht. Als maßgebliche Komponenten der Lichtreaktion sind die sogenannten Photosynthesepigmente beteiligt. Neben Chlorophyll und Bakteriochlorophyll zählen die Carotinoide und Biline mit den wichtigsten Vertretern Phycocyanin und Phycoerythrin dazu. Diese Pigmente nehmen unterschiedliche Funktionen in der Photosynthese wahr, dabei dienen sie vornehmlich der Lichtabsorption und dem Energietransfer zum Reaktionszentrum. Aber auch die Photochemie selbst und der Schutz vor überschüssiger Energie zählt zu ihren Aufgaben. Die photoinduzierte Ladungstrennung von Elektronen entlang der Thylakoidmembran ist an einen Protonentransport gekoppelt, sodass über die Membran ein elektrochemisches Potenzial aufgebaut wird. Als Ergebnis der Potenzialdifferenz erfolgt die protonengetriebene Synthese

des Energieäquivalents Adenosin-5'-triphosphat (ATP). Das Reduktionsäquivalent Nicotinamadenindinucleotidphosphat (NADPH) wird am Ende der linearen Elektronentransportkette gebildet. ATP und NADPH stehen dann einer Vielzahl energieverbrauchender Stoffwechselvorgänge zur Verfügung, wie z. B. der Assimilation von Kohlenstoff, Stickstoff oder Schwefel.

Die Photosynthese, als eine für alles Leben elementarere Voraussetzung, zeichnet sich auch durch bis heute noch unverstandene Teilbereiche aus, sodass sich verschiedenste Wissenschaftler fortwährend mit der Untersuchung dieses biologischen Schlüsselprozesses befassen (Emerson & Lewis, 1943; Hill & Bendall, 1960; Deisenhofer *et al.*, 1984; Umena *et al.*, 2011). Prinzipiell wurden die Strukturen photosynthetischer Proteinkomplexe mit ihren funktionalen Pigmenten und weiteren Cofaktoren aufgeklärt. Demgegenüber gibt es aber trotz der intensiven Forschung an Tetrapyrrolen und der Gewinnung eindrucksvoller Ergebnisse in den letzten hundert Jahren weiterhin ungelöste Fragen bezüglich regulatorischer Mechanismen der aufeinander abgestimmten Synthese von Pigmenten und kern- sowie plastidenkodierten Apoproteinen. Gerade die vollständige Assemblierung dieser photosyntheserelevanten Komponenten stellt ein zentrales Untersuchungsgebiet dar.

## 1.2 Die Chlorophyllbiosynthese – ein Abschnitt des Tetrapyrrolstoffwechselweges

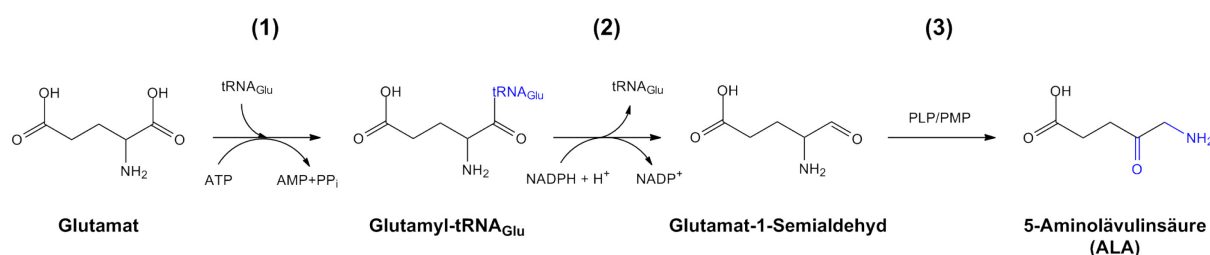
Chlorophyll gehört neben Häm, Sirohäm, Vitamin B<sub>12</sub>, Coenzym F<sub>430</sub> und den Bilinen zu einer biologisch essenziellen Molekülfamilie, deren Vertreter aufgrund ihrer Bedeutsamkeit in der Literatur als Pigmente des Lebens bezeichnet werden (Battersby *et al.*, 1980). Diese Naturfarbstoffe gehören zu den Tetrapyrrolen, die ein Grundgerüst aus vier, über Methylen- oder Methinbrücken miteinander verbundenen Pyrrolringen gemein haben. Das Photosynthesepigment Chlorophyll leitet sich wie die meisten zyklischen Tetrapyrrole vom Porphyrin ab. Die Stoffklasse der Porphyrine besitzt ein ausgedehntes  $\pi$ -Elektronensystem mit teilweise aromatischem Charakter, welches das sichtbare Licht selektiv absorbiert und somit die charakteristische Farbigkeit der Porphyrine bewirkt. Ihre Fähigkeit zum Energie- und Elektronentransfer macht die Porphyrine für die zellulären energetischen Prozesse unabhömmlich und führte zur ubiquitären Verbreitung in allen Organismen. Dabei entscheiden die Art des komplexierten Metallatoms und die Art der Ringsubstituenten über deren Funktion. Die ubiquitären Tetrapyrrole werden zum Teil über den gleichen Weg synthetisiert, wie das gemeinsame Grundgerüst impliziert. Thematische Übersichten gaben



z. B. Beale (1999), Chew & Bryant (2007), Tanaka & Tanaka (2007), Mochizuki *et al.* (2010) oder Tanaka *et al.* (2011). Die biochemischen Reaktionen wurden weitestgehend beschrieben und Gene identifiziert, die für an diesem Stoffwechselweg beteiligte Enzyme kodieren. Gleichwohl sind nach wie vor gewisse Aspekte des Chlorophyllstoffwechsels ungeklärt und damit fortdauernd Gegenstand intensiver Forschung.

### 1.2.1 Die Synthese von 5-Aminolävulinsäure

Das erste, gemeinsame Intermediat, das ausschließlich der Tetrapyrrolbiosynthese als Vorstufe dient, ist die 5-Aminolävulinsäure (ALA). In der Natur existieren für die Bildung von ALA zwei unterschiedliche Synthesewege: der Shemin- und der C<sub>5</sub>-Weg. Bisher sind nur wenige Organismen bekannt, bei denen beide Synthesewege parallel existieren, wie z. B. *Euglena gracilis* (Weinstein & Beale, 1983). Der nach seinem Entdecker benannte Shemin-Weg ist nur in den Mitochondrien von nicht photosynthetisch aktiven Eukaryoten, wie Menschen, Tieren und Pilzen sowie in  $\alpha$ -Proteobakterien zu finden. Durch Kondensation von Succinyl-CoA mit Glycin unter Decarboxylierung und Freisetzung von Coenzym A entsteht hierbei ALA (Shemin & Russel, 1953).



**Abbildung 1:** Erster Abschnitt der Chlorophyllbiosynthese - Die Synthese von 5-Aminolävulinsäure über den C<sub>5</sub>-Weg. Die Enzyme, die die jeweiligen nummerierten Reaktionen katalysieren sind die (1) Glutamyl-tRNA-Synthetase, (2) Glutamyl-tRNA-Reduktase und (3) Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase, der Pyridoxalphosphat (PLP) bzw. Pyridoxaminphosphat (PMP) als Cofaktor dient.

Erst 20 Jahre später wurde in Pflanzen ein alternativer Syntheseweg zur Bildung von ALA gefunden, welcher sogar den evolutionär älteren der beiden ALA-Synthesewege darstellt (Woese, 1987). Nachdem gezeigt wurde, dass das Kohlenstoffgerüst des Glutamats vollständig zu ALA umgewandelt wird (Beale *et al.*, 1975), konnte etwa 10 Jahre später die Beteiligung der Glutamyl-tRNA (tRNA<sub>Glu</sub>) belegt werden (Huang & Wang, 1986). Der C<sub>5</sub>-Weg, der in den Chloroplasten der Pflanzen und Algen, aber auch in Cyanobakterien und in den meisten Eubakterien abläuft, umfasst drei Teilschritte (Abbildung 1). Zunächst wird die Aminosäure Glutamat enzymatisch an die tRNA<sub>Glu</sub> gebunden, um anschließend in dieser

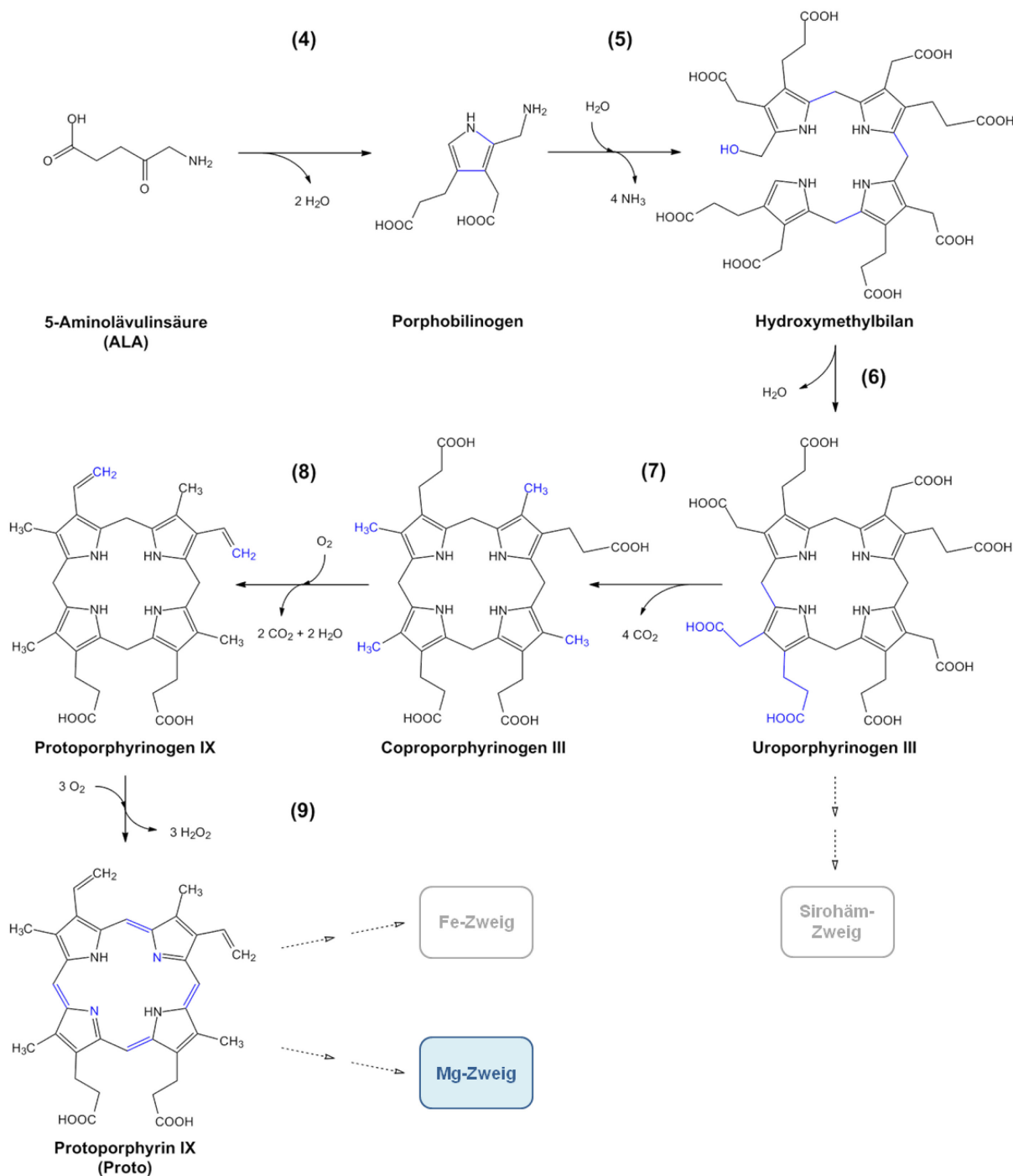
aktivierten Form NADPH-abhängig zum Glutamat-1-Semialdehyd reduziert zu werden, wobei gleichzeitig  $\text{tRNA}_{\text{Glu}}$  frei wird (Abbildung 1, Schritt 1-2). In der folgenden Transaminierungsreaktion wird letztlich aus Glutamat-1-Semialdehyd durch intramolekulare Verschiebung einer Aminogruppe ALA gebildet (Beale, 1999) (Abbildung 1, Schritt 3).

### 1.2.2 Die Synthese von Protoporphyrin IX

Die nächsten Schritte im Syntheseweg von ALA zum ersten makrozyklischen Tetrapyrrol, dem Uroporphyrinogen III, verlaufen in allen Lebewesen über identische Zwischenprodukte. Unterschiede bestehen allein in der Lokalisation der einzelnen Enzyme, die abhängig vom Organismus ihre katalytische Funktion, in den Mitochondrien, im Zytoplasma oder in den Chloroplasten ausüben.

Aus zwei Molekülen ALA wird zunächst das asymmetrische Pyrrolderivat Porphobilinogen gebildet (Abbildung 2, Schritt 4). Diese Reaktion wird durch die ALA-Dehydratase bzw. Porphobilinogen-Synthase katalysiert (Schmid & Shemin, 1955). Durch das Zusammenwirken zweier Enzyme polymerisieren erst vier Moleküle Porphobilinogen zum linearen Tetrapyrrol Hydroxymethylbilan und bilden schließlich das erste zyklische Tetrapyrrol Uroporphyrinogen III nach Inversion eines der vier Ringe (Abbildung 2, Schritt 5-6). Die beiden hierbei beteiligten Enzyme sind die Porphobilinogen-Deaminase (Bogorad, 1958a) und die Uroporphyrinogen-III-Synthase (Bogorad, 1958b). Die Asymmetrie des entstehenden Uroporphyrinogens III ist essenziell für die korrekte Interaktion mit den nachfolgenden Enzymen, denn auf der Stufe dieses Tetrapyrrols kommt es zu einer Verzweigung des Biosyntheseweges. Ein Weg führt über Precorrin-2 zu dem mikrobiellen Corrinoid Vitamin B<sub>12</sub>, zum Sirohäm der Pflanzen und Bakterien sowie zum Corphin F<sub>430</sub> methanogener Archaea (Battersby, 2000). Über den anderen Weg wird die Biosynthese von Chlorophyll und Häm koordiniert. Dazu werden zunächst vier Acetatreste des Uroporphyrinogens III schrittweise zu Methylgruppen decarboxyliert (Granick & Mauzerall, 1958) (Abbildung 2, Schritt 7). Das so gebildete Coproporphyrinogen III wird anschließend durch oxidative Decarboxylierung zu Protoporphyrinogen IX umgesetzt. (Abbildung 2, Schritt 8). Die Bildung dieser Divinyl-Verbindung kann durch zwei Typen von Coproporphyrinogen-III-Oxidasen katalysiert werden: dem sauerstoffabhängigen sowie dem sauerstoffunabhängigen Enzym (Seehra *et al.*, 1983). In der nächsten Reaktion oxidiert die Protoporphyrinogen-IX-Oxidase das Protoporphyrinogen IX zum letzten gemeinsamen Vorläufermolekül der Chlorophylle und Häme, dem Protoporphyrin IX (Proto) (Jacobs &

Jacobs, 1984) (Abbildung 2, Schritt 9). Hierbei werden drei hintereinander folgende Desaturierungen und eine Tautomerisierung durchlaufen, wodurch das konjugierte Doppelbindungssystem des Protoporphyrins entsteht.

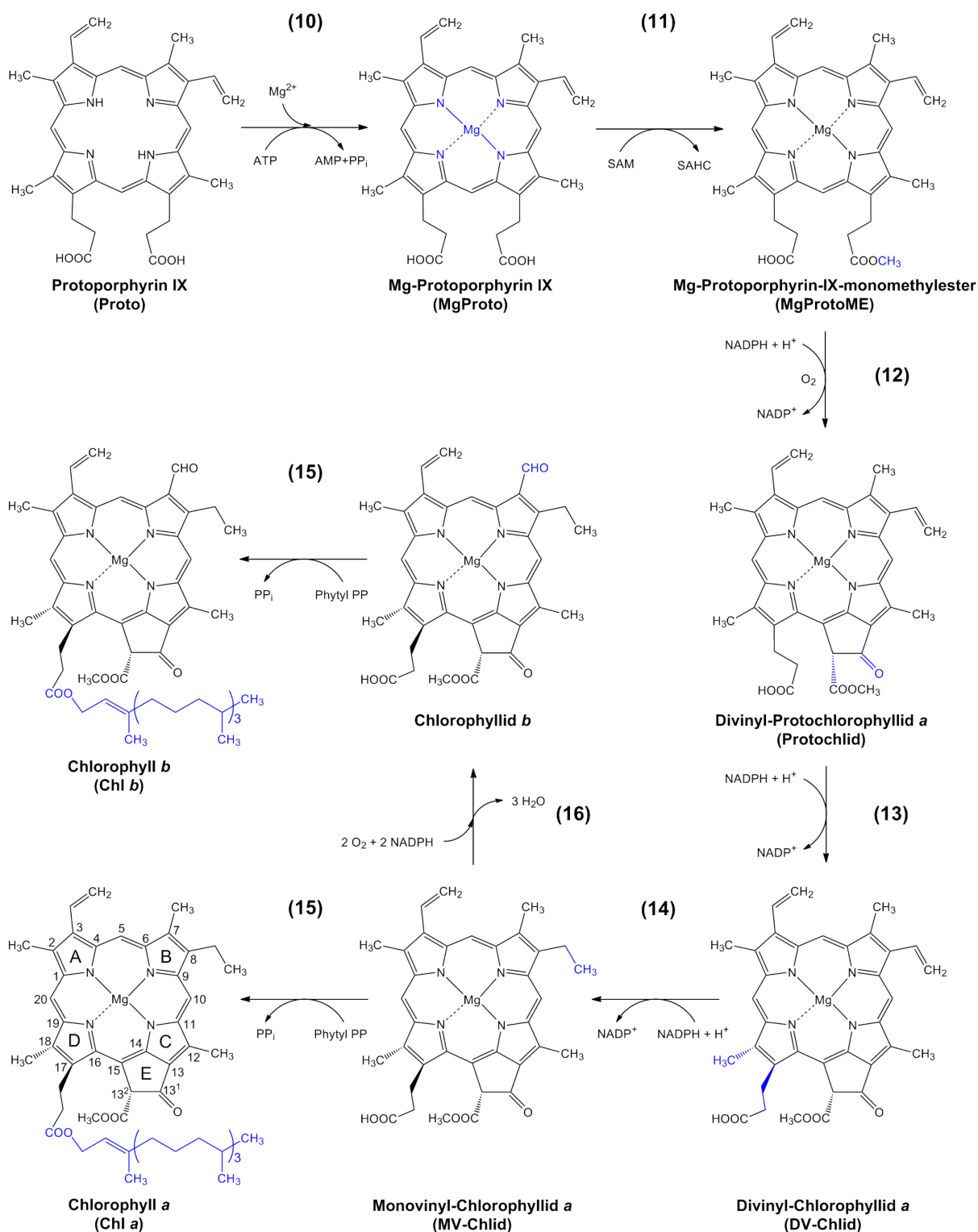


**Abbildung 2:** Ausschnitt der Chlorophyllbiosynthese - Die Synthese von Protoporphyrin IX ausgehend von 5-Aminolävulinat. Die Enzyme, die die jeweiligen nummerierten Reaktionen katalysieren sind die (4) Porphobilinogen-Synthase, (5) Hydroxymethylbilan-Synthase, (6) Uroporphyrinogen-III-Synthase, (7) Uroporphyrinogen-III-Decarboxylase, (8) Coproporphyrinogen-III-Oxidase und (9) Protoporphyrinogen-IX-Oxidase.

### 1.2.3 Die Reaktionswege des Mg-Zweiges der Tetrapyrrolbiosynthese

Ausgehend vom Proto spaltet sich der Syntheseweg einerseits in den Häm und Bilin bildenden Fe-Zweig und andererseits in den Chlorophyll bzw. Bakteriochlorophyll bildenden Mg-Zweig auf. Auch wenn die Komplexierung des Eisen- und des Magnesiumatoms prinzipiell analog erfolgt, so unterscheiden sich beide Abläufe doch deutlich hinsichtlich der Anforderungen der beteiligten Enzyme, ihren Eigenschaften sowie Reaktionsmechanismen (Beale, 1999). Für die Insertion des Eisens, katalysiert durch die monomere oder homodimere Ferrochelatase (Fe-Chelatase), sind keine Cofaktoren erforderlich (Cornah *et al.*, 2003). Von dem entstehenden Protohäm IX leiten sich schließlich alle Häm- und Bilinprodukte ab. Im Gegensatz dazu erfolgt die Komplexierung von  $Mg^{2+}$  ATP-abhängig durch die heterotrimere Magnesiumchelatase (Mg-Chelatase) (Cornah *et al.*, 2003). Der Kontrollmechanismus zur Verteilung des Proto an die konkurrierenden Chelatasen der Chlorophyll- und Hämbiosynthese ist noch nicht bekannt. Allerdings konnten zum einen zwei Protoporphyrinogen-IX-Oxidasen in *Nicotiana tabacum* identifiziert werden, von denen eine in die Plastiden und die andere in die Mitochondrien importiert wird (Lermontova *et al.*, 1997). Zum anderen sind vermutlich die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Chelatasen entscheidend für die Regulation der Substrataufteilung (Cornah *et al.*, 2003).

Das Reaktionsprodukt der Mg-Chelatase ist das Mg-Protoporphyrin IX (MgProto), dessen Propionatseitenkette am Ring C in der folgenden Reaktion verestert wird (Radmer & Bogorad, 1967) (Abbildung 3, Schritt 10-11). Die S-Adenosyl-L-methionin-abhängige MgProto-Methyltransferase, hier kurz Methyltransferase, schafft damit die Voraussetzung für die anschließende Zyklisierungsreaktion. Das gebildete Mg-Protoporphyrin-IX-monomethylester (MgProtoME) wird dann über zwei Zwischenprodukte zum Divinyl-Protophlorophyllid *a* (Protochlid) umgewandelt (Abbildung 3, Schritt 12). Diese Reaktion wird durch die MgProtoME-Cyclase katalysiert, welche im Abschnitt 1.3 näher erläutert wird. Nach Bildung des fünften, isozyklischen Ringes erfolgt die Umsetzung des Protochlids. Der D-Ring von Protochlid wird durch die NADPH:Protochlid-Oxidoreduktase (POR) unter Bildung von Divinyl-Chlorophyllid *a* reduziert (Abbildung 3, Schritt 13). Bemerkenswerterweise katalysieren zwei strukturell unterschiedliche, nicht miteinander verwandte Enzyme diese Reaktion: ein lichtabhängiges, homopolymeres Enzym (Apel *et al.*, 1980; Masuda & Takamiya, 2004) und ein lichtunabhängiges, heterotrimeres Enzym (Suzuki & Bauer, 1992; Burke *et al.*, 1993).



**Abbildung 3:** Finaler Abschnitt der Chlorophyllbiosynthese - Die Synthese von Chlorophyll *a* im Mg-Zweig. Die Enzyme, die die jeweiligen nummerierten Reaktionen katalysieren sind die (10) Magnesiumchelatase, (11). S-Adenosyl-L-methionin-abhängige Mg-Protoporphyrin IX-Methyltransferase, (12) Mg-Protoporphyrin-IX-monomethylester-Cyclase, (13) NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase, (14) Divinyl-Reduktase, (15) Chlorophyll-Synthase und (16) Chlorophyllid-*a*-Oxygenase. Die konventionelle Nummerierung der C-Atome und Pyrrolringe durch die *International Union Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) ist in der Struktur des Chlorophylls *a* gezeigt.

Die lichtunabhängige POR ist weitgehend in allen photosynthetischen Bakterien vorhanden. Cyanobakterien und einige photosynthetische Eukaryoten, wie Algen, Farne und Gymnospermen, nutzen beide POR-Enzyme, wohingegen Angiospermen ausschließlich die lichtabhängige POR besitzen. Das Vorhandensein des lichtunabhängigen Enzyms ermöglicht jenen Organismen Chlorophyll im Dunkeln zu synthetisieren.

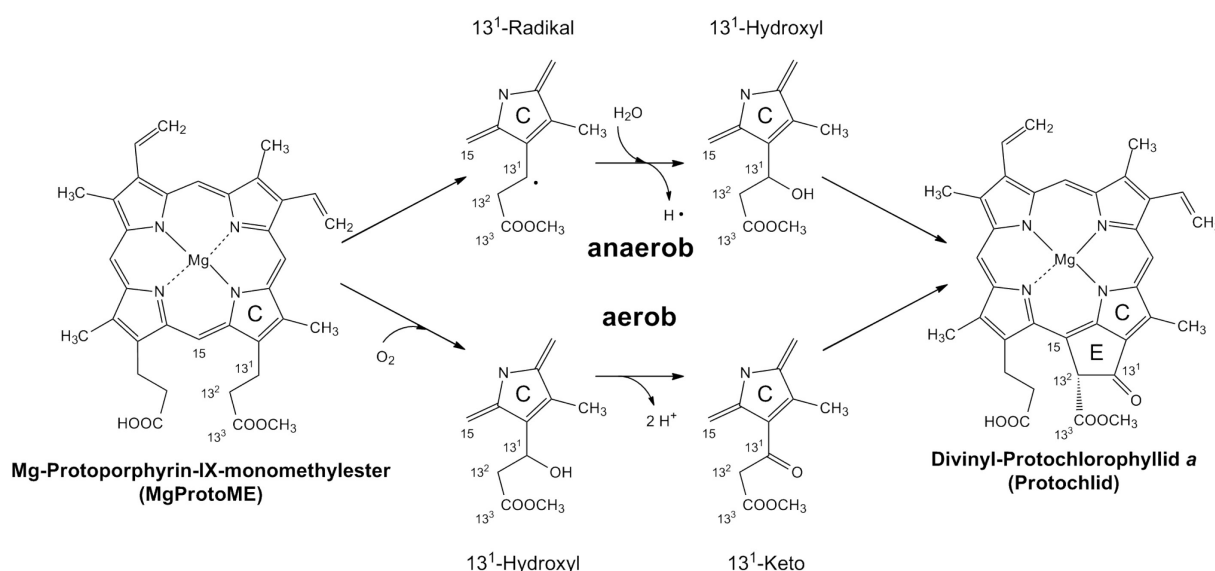
Die weitere Reduktion der C8-Vinylgruppe des B-Ringes der Porphyrinstruktur zu einer Ethylgruppe erfolgt durch die Divinyl-Reduktase (auch als 8-Vinyl-Reduktase bezeichnet), wodurch Monovinyl-Chlorophyllid *a* gebildet wird (Abbildung 3, Schritt 14). Diesem Enzym kann neben Divinyl-Chlorophyllid *a* auch Protochlid als Substrat dienen, sodass eine Mehrfachverzweigung der Chlorophyllbiosynthese diskutiert wird (Tripathy & Rebeiz, 1988; Rebeiz *et al.*, 2003; Kolossov & Rebeiz, 2010). Da allerdings die katalytische Effizienz für Protochlid deutlich geringer ist, wurde die konventionelle Abfolge der Reaktionsschritte dahingehend geändert, dass die Divinyl-Reduktase nach der POR-Reaktion dargestellt wird (Nagata *et al.*, 2007; Tanaka & Tanaka, 2007).

Die Chlorophyllbiosynthese führt zunächst immer zum Chlorophyll *a*, welches im letzten Syntheseschritt durch die Chlorophyll-Synthase aus Monovinyl-Chlorophyllid *a* gebildet wird (Abbildung 3, Schritt 15). Dabei erfolgt eine Veresterung des Propionatrestes von Ring D mit der hydrophoben Kette des Phytylpyrophosphats oder Geranylgeranyl-pyrophosphats (Von Wettstein *et al.*, 1995). Chlorophyll *a* bzw. sein Vorläufer wird letztlich dann in der Thylakoidmembran durch die Chlorophyllid-*a*-Oxygenase zunächst in Chlorophyllid *b* umgewandelt (Bollivar, 2006), welches umgehend durch die Chlorophyll-Synthase zu Chlorophyll *b* phytyliert wird (Oster *et al.*, 2000) (Abbildung 3, Schritt 16 und 15). Es sei darauf hingewiesen, dass unter den Organismen, die eine oxygene Photosynthese betreiben, nur Landpflanzen, Grünalgen und eine kleine Gruppe an Cyanobakterien (Prochlorophyten) vermögen Chlorophyll *b* zu synthetisieren.

### **1.3 Die Mg-Protoporphyrin-IX-monomethylester-Cyclase – ein Enzym der Chlorophyllbiosynthese**

Die oxidative Zyklisierungsreaktion ist ein zentraler und entscheidender Schritt in der Chlorophyllbiosynthese. Hierbei werden die Mg-Porphyrine durch Bildung eines fünften Zyklopentanonringes am Pyrrolring C modifiziert. Diese Mehrschritt-Reaktion wird durch das

Enzym MgProtoME-Cyclase (EC 1.14.13.81; im Folgenden als Cyclase bezeichnet) katalysiert. Allerdings sind der zugrundeliegende biochemische Reaktionsablauf, die genetischen Hintergründe und die Struktur des Enzyms längst noch nicht vollständig charakterisiert (Beale, 1999; Willows, 2003). In Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt haben sich in photosynthetischen Organismen unabhängig voneinander zwei strukturell verschiedene, nicht verwandte Cyclase-Enzyme entwickelt. In Pflanzen wird *in vivo* die Umwandlung des MgProtoME in das Protochlid ausschließlich durch eine sauerstoffabhängige Cyclase bewirkt. Purpurbakterien sowie Cyanobakterien besitzen hingegen je nach Sauerstoffangebot Gene für beide Enzyme, die entweder sauerstoffabhängig oder sauerstoffunabhängig die Reaktion katalysieren (Gough *et al.*, 2000; Ouchane *et al.*, 2004). Die Reaktionsmechanismen sind in der Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4:** Reaktionsmechanismus der sauerstoffabhängigen (unten) und -unabhängigen (oben) MgProtoME-Cyclase.

Bei der anaeroben Cyclase-Reaktion wird zunächst mithilfe eines Cofaktor-Radikals der methylierten Propionatseitenkette an der C13<sup>1</sup>-Position ein Wasserstoffatom entzogen und so das 13<sup>1</sup>-Radikal gebildet. Anschließend geht nach Elektronenabgabe und Angriff durch das Hydroxid-Anion, das vom Wasser stammt, das 13<sup>1</sup>-hydroxylierte MgProtoME-Derivat hervor. Die schrittweise Freisetzung von vier Wasserstoffatomen führt zuletzt zur Bildung des Protochlids mit dem charakteristischen fünften Ring. Demzufolge fungiert die Cyclase unter anaeroben Bedingungen als eine Dehydrogenase/Hydratase, die den Sauerstoff aus Wassermolekülen bezieht (Porra *et al.*, 1995). Die Genanalyse von MgProtoME-akkumulierenden Mutanten führte zur Entdeckung des *bchE*-Gens in dem Purpurbakterium

*Rhodobacter capsulatus*, welches für eine Komponente der sauerstoffunabhängigen Cyclase codiert (Yang & Bauer, 1990; Bollivar *et al.*, 1994). Im Allgemeinen konnten *bchE*-Homologe in allen photosynthetischen Bakterien, allerdings nicht in Pflanzen oder der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden werden (Ouchane *et al.*, 2004). Sequenzanalysen der bakteriellen BchE-Proteine ergaben, dass drei charakteristische Cysteinreste (CXXXCXXC) ein typisches Eisen-Schwefel-Bindemotiv bilden. Dieses Peptidmotiv ist auch für andere anaerobe Oxidoreduktasen kennzeichnend (Ouchane *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass der Eisen-Schwefel-Cluster des Enzyms als Elektronenakzeptor maßgeblich an dieser radikal-chemischen Reaktion beteiligt ist (Gough *et al.*, 2000).

Über das Erfordernis von Sauerstoff sowie die Beteiligung von  $\text{Fe}^{2+}$  an der Reaktion wurde bereits Anfang der 80er Jahre berichtet (Chereskin *et al.*, 1982; Walker *et al.*, 1988). Diese Ergebnisse wurden durch *in vitro*-Aktivitätsversuche mit Gurkenkeimblätter-Extrakten, lysierten Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii*, Etioplasten aus Weizen und *Synechocystis*-Extrakten bestätigt (Nasrulhaq-Boyce *et al.*, 1987; Bollivar *et al.*, 1995; Bollivar & Beale, 1996). Des Weiteren gaben die Experimente mit Gurken-Chloroplasten darüber Aufschluss, welche zusätzlichen Faktoren zur vollständigen Wiederherstellung der Cyclase-Aktivität benötigt wurden. So sind in einem alkalischen Puffer neben MgProto als Substrat, molekularen Sauerstoff und  $\text{Fe}^{2+}$  auch NADPH,  $\text{Mg}^{2+}$  sowie die lösliche und membrangebundene Fraktion von Chloroplasten oder Cyanobakterien erforderlich (Fuesler *et al.*, 1984; Wong & Castelfranco, 1984; Walker *et al.*, 1991). Die Beteiligung zweier unterschiedlicher Protein-Komponenten in den Cyclase-Enzym-Assays implizierte, dass ebenfalls mindestens zwei Genprodukte involviert sein müssten (Walker *et al.*, 1991).

Die sauerstoffabhängige Cyclase-Reaktion folgt einem dreischrittigen Mechanismus (Chereskin *et al.*, 1982; Bollivar & Beale, 1996). Zunächst wird unter Verwendung von Luftsauerstoff eine stereospezifische Hydroxylierung an der  $\beta$ -Position (C13<sup>1</sup>) der methylierten Propionatseitenkette des Ringes C durchgeführt. Nachdem im nächsten Schritt die entstehende Hydroxylgruppe zur Carbonylgruppe oxidiert wird, resultiert die Bildung des Cyclopentanon-Ringes E aus einem oxidativen Ringschluss (Granick & Jaffe, 1961; Chereskin *et al.*, 1982; Walker *et al.*, 1988; Bollivar & Beale, 1996). Die erste Proteinkomponente der sauerstoffabhängigen Cyclase – bezeichnet als AcsF für *aerobic cyclization system Fe-containing subunit* – wurde in dem Purpurbakterium *Rubrivivax gelatinosus* entdeckt (Pinta *et al.*, 2002). Dieses Purpurbakterium vermag Bakteriochlorophyll



*a* sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen zu synthetisieren (Porra *et al.*, 1998). Die Inaktivierung des *acsF*-Gens führte unter aeroben Bedingungen zur Akkumulation von MgProtoME, wohingegen die Bakteriochlorophyllsynthese unter anaeroben Bedingungen nicht beeinträchtigt wurde (Pinta *et al.*, 2002). AcsF-Homologe wurden in vielen pro- und eukaryotischen, Photosynthese betreibenden Organismen gefunden, die zur Familie der Di-Eisen-Carboxylat-Proteine gehören und zwei typische Eisenbindungsmotive (D/E) $X_n$ DEXXH gemein haben (Berthold & Stenmark, 2003; Ouchane *et al.*, 2004). Sequenzvergleiche unter den *acsF*-Homologen ließen eine Ähnlichkeit zu dem *PNZIP*-Gen aus *Pharbitis nil* erkennen, welches Phytochrom-induziert exprimiert wird und im Nachhinein funktionell der Chlorophyllbiosynthese zugewiesen werden kann (Zheng *et al.*, 1998). *Chlamydomonas reinhardtii* kann ebenfalls unter sauerstofflimitierenden Bedingungen Photosynthese betreiben, wenn sie auch über kein homologes BchE-Protein verfügt. Dafür werden aber zwei AcsF-Homologe durch das Genom kodiert: *CRD1* und *CTH1* (Moseley *et al.*, 2000; Moseley *et al.*, 2002). Erstaunlicherweise erfolgt die Expression von *CRD1* und *CTH1* reziprok und wird durch Kupfer und Sauerstoff reguliert. So wird *CRD1* bei geringem Sauerstoffgehalt und/oder Kupferlimitation exprimiert, während *CTH1* unter sauerstoffangereicherten Bedingungen und bei ausreichendem Kupfergehalt exprimiert wird (Moseley *et al.*, 2000). Das *acsF*-homologe Gen in *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) war das zuerst identifizierte Gen für ein Protein der aeroben Cyclase-Reaktion in höheren Pflanzen und wurde als *CHL27* bezeichnet (Tottey *et al.*, 2003). Ebenso kodiert das homologe Gen *Xantha-1* aus Gerste eine essenzielle Komponente des Cyclase-Enzyms (Rzeznicka *et al.*, 2005). In *Synechocystis* gibt es zwei *acsF*-ähnliche Gene, *sll1214* (*ycf59*, *chlA<sub>I</sub>/cycI*) und *sll1874* (*chlA<sub>II</sub>/cycII*) (Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009). Obwohl das *bchE*-homologe Gen *chlE* (*slr0905*) aus *Synechocystis* zwar eine *bchE*-defiziente Mutante von *Rhodobacter capsulatus* komplementieren kann, hat ein *chlE*-knockout in *Synechocystis* selbst keinen Effekt auf die Chlorophyllbiosynthese unter verschiedenen, getesteten Wachstumsbedingungen (Bollivar, 2006). Unter aeroben Bedingungen ist das ChlA<sub>I</sub>/CycI-Protein essenziell, wohingegen das *chlA<sub>II</sub>/cycII*-Gen offenbar für das Wachstum bei Sauerstofflimitation erforderlich ist (Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009).

Wissenschaftler sind sich mittlerweile einig, dass das AcsF-ähnliche Protein allein nicht imstande ist, *in vitro* die Cyclase-Reaktion zu bewerkstelligen. Aufgrund der vorhandenen, potenziell katalytischen Eisenbindedomäne in der Proteinstruktur wird die Ähnlichkeit von AcsF/CHL27-Homologen zu den Monooxygenase-verwandten Proteinen verdeutlicht.

Infolgedessen wird spekuliert, dass das vollständige Cyclase-Protein vielmehr ein heterotrimerer Komplex ist, der sich aus einer katalytischen Untereinheit, einer Reduktase und einem sogenannten Gerüstprotein zusammensetzt (Wallar & Lipscomb, 1996; Berthold & Stenmark, 2003). Zumindest wurde nach der Beschreibung der drei nichtallelischen MgProtoME-akkumulierenden Gerstenmutanten vermutet, dass drei Genprodukte die aerobe Cyclase bilden: ein lösliches Protein, eine membrangebundene Komponente, kodiert durch *xantha-l*, und eine weitere membrangebundene Komponente, die vermutlich durch *viridis-k* kodiert wird (Rzeznicka *et al.*, 2005).

Untersuchungen an Tabakpflanzen, die konstitutiv eine Antisense-RNA für *CHL27* exprimieren und sich durch einen stabilen, chlorotischen Phänotyp auszeichnen, zeigten, dass Blattnekrosen nur auftraten, sofern die Pflanzen einem Tag-Nacht-Rhythmus unterlagen. Die *CHL27*-defizienten Pflanzen konnten interessanterweise die MgProtoME-Akkumulationen bei Anzucht unter Dauerlicht tolerieren (Peter *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu verursachen Akkumulationen von Proto oder Protochlid in anderen Mutanten und transgenen Linien, deren Defekte weitere Enzyme der Chlorophyllbiosynthese betreffen, weitaus gravierendere photodynamische Schädigungen (Lermontova *et al.*, 1997; Meskauskiene *et al.*, 2001). Angenommen, dass die Bindung von Porphyrinen und Mg-Porphyrinen an Proteine eine tetrapyrrolvermittelte Photosensibilisierung verhindert, so wäre es höchst interessant, herauszufinden, wie der schädigende Effekt durch hohe MgProtoME-Gehalte unterbunden werden kann.

## 1.4 Regulation der Chlorophyll-Biosynthese

Generell ist der Bedarf an Chlorophyll und dessen Intermediaten in den Zellen stark von dem vorliegenden Zell- und Gewebetyp, aber auch von den unterschiedlichen Entwicklungsstadien des phototrophen Organismus abhängig. Entsprechend muss auf der Ebene der enzymatischen Kapazitäten von Tetrapyrrolbiosynthese-relevanten Proteinen auf diesen Bedarf reagiert werden (Tanaka & Tanaka, 2007; Tanaka *et al.*, 2011). Aber ein noch maßgeblicherer Punkt fordert die strenge Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese, die Vermeidung phototoxischer Chlorophylle und Chlorophyllvorstufen. Denn durch Licht angeregte Tetrapyrrole vermögen die Anregungsenergie auf Sauerstoff zu übertragen, wodurch zellschädigende Radikale und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen können. Die unmittelbare Gefahr, die von sich anhäufenden Chlorophyll-Intermediaten ausgeht, konnte anhand von Porphyrinsynthese-

defizienten Mutanten aufgezeigt werden (Kruse *et al.*, 1995; Mock & Grimm, 1997). Analysen zur Transkriptionskontrolle von Tetrapyrrolbiosynthese-Genen sowie Charakterisierungen von Mutanten und transgenen Linien steuerten maßgeblich zur Aufklärung der komplexen Kontrollmechanismen der Chlorophyllbiosynthese bei (Grimm, 2010). Längst wird nicht mehr von unabhängig verteilten, frei-schwimmenden Enzymen in der löslichen Phase oder in den Membranen subzellulärer Kompartimente ausgegangen. Vielmehr bietet die intrazelluläre und intraorganelläre Topologie die Möglichkeit zur Organisation und Regulation von Stoffwechselwegen (Lunn, 2007). Hierbei schaffen transiente oder stabile Multiproteinkomplexe einen von anderen Reaktionen abgeschirmten Raum für konzentrierte biochemische Reaktionen. Die ersten Hinweise zur suborganellären Lokalisation von Enzymen der Chlorophyllbiosynthese lieferten Lutz *et al.* (1981), durch die Entdeckung der POR in Prolamellarkörpern von Etioplasten. Im Weiteren wurde ein Anteil der zwei Isoformen der Protoporphyrinogen-IX-Oxidase sowohl auf der Stromaseite der Thylakoidmembranen als auch auf der Stromaseite der inneren Chloroplastenhüllmembran gefunden (Che *et al.*, 2000). Vermutlich haben die beiden Isoformen unterschiedliche Funktionen in der Substratbereitstellung inne, einerseits für die Chlorophyllsynthese und andererseits für die Hämsynthese (Watanabe *et al.*, 2001). Zur Organisation von plastidären Subkompartimenten trägt u. a. der Negativregulator „*Fluorescent*“ (FLU) und das Glutamyl-tRNA-Reduktase-Bindeprotein bei. Die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) katalysiert den ratenlimitierenden Schritt der Tetrapyrrolbiosynthese, deren Regulation einer der wesentlichen Kontrollpunkte des Syntheseweges darstellt (Papenbrock & Grimm, 2001; Tanaka *et al.*, 2011). FLU fungiert dabei als essentieller Suppressor der ALA-Synthese im Dunkeln, indem er direkt mit der GluTR interagiert und dessen Aktivität hemmt (Meskauskiene *et al.*, 2001). Infolgedessen wird eine Akkumulation an photoreaktivem Protochlid unterbunden, dass bei Angiospermen nur lichtabhängig weiter metabolisiert werden kann (s. Abschnitt 1.2.3). Die Aktuellen Arbeiten von Kauss *et al.* (2012) belegen darüber hinaus physikalische Interaktionen von FLU mit späteren Enzymschritten der Chlorophyllbiosynthese. Damit vermittelt FLU zusätzlich eine Feedback-Kontrolle zwischen der Chlorophyllbiosynthese und der ALA-Synthese. Das membranassoziierte GluTR-Bindeprotein wiederum beeinflusst nicht die ALA-Syntheserate, dafür trägt es aber vermutlich zur Subkompartimentierung bei, indem es aus dem Pool Stroma-lokalisierter GluTR-Proteine der ALA-Synthese einen Teil für die Hämsynthese bereitstellt (Czarnecki *et al.*, 2011). Eine zusätzliche Feedback-Kontrolle der GluTR erfolgt über den Fe-Zweig der Tetrapyrrolbiosynthese durch vermutlich direkt gebundenes und inhibierendes Häm

(Weinstein *et al.*, 1993; Pontoppidan & Kannangara, 1994; Vothknecht *et al.*, 1998; Goslings *et al.*, 2004; Srivastava & Beale, 2005).

Prinzipiell lieferten Proteom-Analysen neue Einblicke in die Kompartimentierung der Stoffwechselwege im Chloroplasten und zum Teil unerwartete Resultate zur plastidären bzw. subplastidären Lokalisation gewisser Proteine (Joyard *et al.*, 2009; Ferro *et al.*, 2010). Der regulatorische Einfluss der Aufteilung von Chlorophyllbiosynthese-Enzymen und der Anordnung von Chlorophyllbindeproteinen ist dabei erst im Ansatz untersucht (Komenda *et al.*, 2012). Ein neuer Vorschlag zur Organisation des Chlorophyllstoffwechsels wurde durch Tanaka *et al.* (2010) anhand der *Arabidopsis* *lil3.1:lil3.2*-Doppelmutante vorgeschlagen. Das Fehlen des *light-harvesting-like* Proteins LIL3 führt zur Destabilisierung der Geranylgeranyl-Reduktase und damit zu einem Mangel an phytyliertem Chlorophyll. Diese Reaktion ist aber für die stabile Integrierung der Chlorophylle in chlorophyllbindende Proteine der Photosysteme erforderlich (Eichacker *et al.*, 1996). Darüber hinaus scheint LIL3 auch für die Stabilität weiterer Enzyme der Chlorophyllbiosynthese relevant zu sein und vermag Chlorophyllvorstufen zu binden. Es wird spekuliert, dass LIL3 entweder die Intermediate an die jeweiligen Enzyme weiterleitet und/oder Chlorophyll für die Apoproteine der Photosynthese bereitstellt. Folglich könnten der metabolische Fluss innerhalb des Syntheseweges und/oder die Assemblierung der photosynthetischen Antennenkomplexe sowie Reaktionszentren durch LIL3 beschleunigt werden.

## 1.5 Das chloroplastidäre Genom

Chloroplastidäre Genome von photosynthetischen Organismen umfassen typischerweise einzelne, zirkuläre DNA-Moleküle, die auch als multiple Kopien im Chloroplasten vorliegen können (De Las Rivas *et al.*, 2002). Viele Gene chloroplastidärer Genome treten in konservierten, geordneten Cluster auf, die ebenso in Cyanobakterien gefunden werden können (Stoebe & Kowallik, 1999). Diese vergleichenden Clusteranalysen untermauern die von Cavalier-Smith (1982) vertretene Ansicht eines einzelnen, ursprünglichen prokaryotischen/eukaryotischen Endosymbioseereignisses. Demnach wurde ein cyanobakterienähnlicher Vorläufer von einer vermutlich begeißelten eukaryotischen Wirtszelle aufgenommen, sodass alle rezente Plastidentypen aus diesem monophyletischen Ursprung hervorgehen (Palmer, 2000). Im Lauf der Evolution erfolgte eine immense Verkleinerung der plastidären Genome, wie ein Größenvergleich des Chloroplastengenoms

rezenter Pflanzen mit etwa 120-200 Kilobasen (kb) (Lidholm & Gustafsson, 1991; Wakasugi *et al.*, 1997; Yukawa *et al.*, 2006) und des Cyanobakteriengenoms mit 1,8-13,2 Megabasen (Bancroft *et al.*, 1989; Kaneko *et al.*, 1996b; Roca *et al.*, 2003) verdeutlicht. Folglich kodieren Plastome nun für weniger als 100 Proteine (Martin *et al.*, 1998). Als Konsequenz werden rund 2000-3000 Proteine im Zytosol synthetisiert und in den Chloroplasten importiert (Keegstra & Cline, 1999; Leister, 2003). Die Regulation der Chloroplasten-Entwicklung und -Funktion erfordert demnach eine genaue Koordination beider Genome, des Kerngenoms und des Plastoms.

Es gibt mehrere Vermutungen, wie es zu dem Genverlust bzw. zu dem Transfer plastidärer Gene in den Zellkern gekommen sein kann (Allen & Raven, 1996; Howe *et al.*, 2003). Ein Vorschlag zur Abwanderung der Gene in den Zellkern ist die mögliche Vermeidung auftretender, schädlicher Mutationen, infolge freier Sauerstoffradikale der Photosynthese, denen andernfalls chloroplastidäre Gene ausgesetzt sind. Der zweite Vorschlag basiert auf der generell uniparentalen Vererbung der Chloroplasten, die im Gegensatz zum Kerngenom einen asexuellen Genpool aufweisen. Gene, die sexuell weitergegeben werden, sodass eine Neukombination der Erbinformation erfolgt, haben einen Selektionsvorteil (Muller, 1964), der den plastidären Genen durch den Transfer in den Zellkern geboten ist. Aber auch die mögliche Notwendigkeit des Verbleibs gewisser plastidärer Gene wurde diskutiert und auf eine möglichst schnelle Regulation der Expression zentraler Komponenten der Photosynthese als Antwort auf ein sich veränderndes Redox-Gleichgewicht zurückgeführt (Allen, 1993; Pfannschmidt *et al.*, 1999; Race *et al.*, 1999).

Generell wurden die plastidären Gene durch Sugiura (1992) anhand ihrer Funktion in drei Hauptkategorien eingeteilt: Gene, die (1) Komponenten der plastidären Genexpression (ribosomale und transfer-RNAs, ribosomale Proteinuntereinheiten) und (2) Komponenten der Photosynthese sowie (3) offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*) unbekannter Funktion kodieren. Für die letzteren führten Hallick & Bairoch (1994) den Begriff *ycf* (*hypothetical chloroplast open reading frame*) ein. Sequenzanalysen wiesen den bis heute etwa 80 identifizierten *ycfs* (Stoebe & Kowallik, 1999) eine starke Konservierung innerhalb der Plastidengenome von Algen zu, jedoch wurden im Laufe der Evolution einige *ycfs* in das Kerngenom höherer Landpflanzen transferiert. Die Existenz homologer *ycf*-Sequenzen in zahlreichen Cyanobakterien bestärkt die bedeutende Rolle von *ycfs* an gemeinsamen Funktionen von phototrophen Organismen. Erste Funktionsanalysen von bisher 19 *ycf*-Genen

in *Synechocystis* zeigen eine direkte oder indirekte Beteiligung der *ycfs* im Zusammengang mit der Photosynthese bzw. damit assoziierten Prozessen (Boudreau *et al.*, 1997; Wilde *et al.*, 2001; Kashino *et al.*, 2007; Wallner *et al.*, 2012). Neben zahlreichen Komponenten des Elektronentransports, der Photosysteme und der Chlorophyllbiosynthese haben *ycfs* regulatorische Funktionen inne und sind ebenso an Stressantworten beteiligt.

## 1.6 Kommunikation vom Chloroplasten zum Zellkern

Es ist allgemein akzeptiert, dass das Kerngenom die Hauptfunktion in der Kontrolle zellulärer Stoffwechselprozesse übernimmt. Doch wie aus dem vorangegangenen Abschnitt deutlich wurde, sind ebenso plastidäre Genprodukte für eine vollständige Funktionalität der Chloroplasten unerlässlich. Die aufeinander abgestimmte Expression von kern- und plastidenkodierten Proteinen ist auf eine Kommunikation zwischen den Chloroplasten und dem Zellkern angewiesen (Beck, 2001). Der bidirektionale Informationsaustausch kann hierbei von dem Zellkern zum Chloroplasten (anterograd) oder vom Chloroplasten zu dem Zellkern (retrograd) erfolgen. Als mögliche retrograde Signale, die eine Veränderung der nukleären Genexpression initiieren können, werden die plastidäre Genexpression, ROS, der Redox-Zustand der Chloroplasten sowie Stoffwechselprodukte bzw. -intermediate, wie Zucker, Carotinoide und Tetrapyrrole diskutiert (Papenbrock & Grimm, 2001; Rodermel, 2001; Surpin *et al.*, 2002; Pfannschmidt, 2003; Woodson *et al.*, 2011; Woodson *et al.*, 2012). Erste Hinweise, dass Tetrapyrrole und deren Vorstufen retrograde Signale bilden können, lieferten Arbeiten von Johanningmeier & Howell (1984). Fütterungsversuche von *Chlamydomonas reinhardtii* mit dem Eisenchelator 2,2'-Dipyridyl, der u. a. den Cyclase-Reaktionsschritt der Chlorophyllbiosynthese inhibiert, führte zur Anreicherung von MgProtoME und zeitgleicher Reduktion des nukleären, Photosynthese-assoziierten *LHCB*- (*light harvesting complex binding protein*-)Transkripts. Die Hemmung durch das Herbizid Norflurazon resultierte gleichermaßen in einer Verminderung der *LHCB*-Expression (Oelmüller & Mohr, 1986). Im Folgenden wurde nach *Arabidopsis*-Mutanten gesucht, die trotz Inhibierung der Carotinoid-Biosynthese durch Norflurazon, eine Entkopplung der *LHCB*-Expression vom funktionellen Status des Chloroplasten zeigen. Insgesamt wurden sechs nichtallelische Mutanten mit einem Defekt in der Plastidensignalgebung identifiziert und daher als *gun*-Mutanten (*genomes uncoupled*) bezeichnet (Susek *et al.*, 1993). Während *GUN1* für ein Protein der plastidären Genexpression kodiert, sind die anderen fünf

Genprodukte, GUN2 bis GUN6, in die Tetrapyrrolbiosynthese involviert (Surpin *et al.*, 2002). *GUN2* und *GUN3* kodieren für die Häm-Oxygenase bzw. Phytochromobilin-Synthase. *GUN4* und *GUN5* sind für den MgProto-Syntheseschritt essenziell, sie kodieren für einen Aktivator der Mg-Chelatase bzw. die katalytische H-Untereinheit der Mg-Chelatase selbst (Mochizuki *et al.*, 2001; Larkin *et al.*, 2003). Der *gun6*-Phänotyp wird interessanterweise durch eine Überexpression der plastidären Fe-Chelatase 1 und damit einhergehender Steigerung des metabolischen Flusses innerhalb des Häm-Zweiges hervorgerufen (Woodson *et al.*, 2011). Die deutlichen Hinweise auf eine Beteiligung von Tetrapyrrolen an der retrograden Signalgebung veranlassten Strand *et al.* (2003) zu der Annahme, dass MgProto als Plastidensignal fungiert. Allerdings sprechen neuere Studien gegen diese Vorstellung, da kein eindeutiger Zusammenhang zwischen MgProto-Akkumulationen und einer veränderten nukleären Genexpression zu bestehen scheint (Mochizuki *et al.*, 2008; Moulin *et al.*, 2008). Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Biosynthese, Akkumulation oder auch Degradation von Tetrapyrrolen mit der Chloroplastenentwicklung, Photomorphogenese und Plastid-Zellkern-Kommunikation in Verbindung stehen. Zudem kann Häm als positiver Regulator der nukleären Genexpression auch auf die *gun2-5*-Mutanten übertragen und somit als retrogrades Signal diskutiert werden (Beale, 2011; Terry & Smith, 2013).

## **1.7 Zielsetzung dieser Arbeit**

Chlorophyll unterscheidet sich von anderen Tetrapyrrol-Stoffwechselendprodukten durch die Ausbildung eines fünften Cyclopentanon-Ringes am Pyrrolring C. Der komplexe enzymatische Schritt zum oxidativen Ringschluss wird durch die MgProtoME-Cyclase katalysiert. Erst vor wenigen Jahren wurde ein Gen (*CHL27/ycf59*) identifiziert, welches für die putative substratbindende und katalytische Untereinheit der sauerstoffabhängigen Cyclase kodiert (Tottey *et al.*, 2003; Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009). Trotz des stetigen Wissensfortschrittes, der zur Aufklärung des Cyclase-Reaktionsmechanismus führte, sind die beteiligten Proteine an diesem Enzymschritt und deren posttranslationale Kontrolle noch nicht erforscht.

Vor dem Hintergrund, dass bereits funktionelle Analysen hoch konservierter *ycf*-Gene zur Identifizierung Chlorophyllbiosynthese-relevanter Genprodukte führten (Wilde *et al.*, 2004; Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009), war es das Ziel dieser Arbeit, durch die Charakterisierung des bis dato unbekannten *ycf54*-Gens weitere Einblicke in plastidäre

Stoffwechselwege zu gewinnen. Hierbei dienten das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 sowie die höheren Pflanzen *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis* als Modellorganismen. Die kombinierten Analysen in Pro- und Eukaryoten können tiefergehende Einblicke in die Funktionsweise und die evolutiven Besonderheiten des Genproduktes ermöglichen. Die vergleichende physiologische Charakterisierung anhand von transgenen Cyanobakterien und Pflanzen mit deregulierter Expression des *ycf54*-Gens stand hierbei im Mittelpunkt. Mögliche Auswirkungen auf die Chlorophyllbiosynthese bzw. auf die Aktivitäten der in diesem Stoffwechselweg involvierter Enzyme sollten analysiert werden, um Rückschlüsse auf regulatorische Schritte ziehen zu können. Ferner galt es neben Genexpressionsanalysen physikalische Protein-Protein-Interaktionen aufzuzeigen.

Ein weiteres Augenmerk dieser Arbeit lag darin, unser Verständnis über retrograde Signale in der Kommunikation vom Chloroplast zum Zellkern zu erweitern. Die derzeit am meisten charakterisierten, aber auch am häufigsten kontrovers diskutierten Plastidensignale stammen aus dem Tetrapyrrolbiosyntheseweg. Um das Konzept tetrapyrrolvermittelter Signalgebung zu untersuchen, kam die Technik der induzierten Gendeaktivierung mithilfe von RNA-Interferenz zur Anwendung. Transgene *Arabidopsis*-Linien sollten generiert werden, deren Expression von Chlorophyllbiosynthese-Genen herunter reguliert werden kann. Die resultierenden Aktivitätsverringerungen der korrespondierenden Enzyme bilden eine Grundlage dafür, frühe Veränderungen der nukleären Genexpression zu distinkten Zeitpunkten aufzudecken. Ferner wurden auch photoautotrophe *Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen herangezogen, um den Einfluss von Tetrapyrrolintermediaten und -effektoren vergleichend zu analysieren.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Geräte sind in diesem Kapitel aufgeführt. Allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien, wie z.B. Sicherheitshandschuhe, Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Glasgefäße, Petrischalen, Einmal-Küvetten, Pflanzenkultivierungstöpfe und -schalen sind nicht gesondert beschrieben.

#### 2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.A.). Sofern nicht anders angegeben wurden die Chemikalien und Feinchemikalien von den Firmen AppliChem (Darmstadt, GER), Merck (Darmstadt, GER), Roth (Karlsruhe, GER), Sigma-Aldrich (München, GER) oder Serva (Heidelberg, GER) bezogen. Verwendete organische Lösungsmittel stammten von den Firmen VWR (Darmstadt, GER) und Th. Geyer (Renningen, GER).

#### 2.1.2 Antikörper

Für die immunologische Detektion von Proteinen im Western-Blot-Verfahren (s. Abschnitt 2.2.3.8) wurden die in Tabelle 1 aufgelisteten Antikörper verwendet.

**Tabelle 1:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper (Fortsetzung auf den folgenden Seiten).

Name	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller/Referenz
ANTI-FLAG®	Maus-IgG, monoklonaler Primärantikörper M2 gerichtet gegen das FLAG-Epitop, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)	1:2500	Sigma-Aldrich (München, GER)
anti-HemH	Kaninchen-IgG polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die Fe-Chelatase aus <i>Synechocystis</i>	1:3000	Pineda - Antikörper Service (Berlin, GER)
Anti-PsaC	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen ein in allen PsaC-Proteinen vorkommendes Peptid	1:3000	Agrisera AB (Vännäs, SWE)
anti-PsaL	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen	1:4000	P. R. Chitnis, Iowa State University, Ames, USA

	die PSI-Untereinheit Psal aus <i>Synechocystis</i>		
anti-PsbA	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen PSII-Untereinheit PsbA aus <i>Synechocystis</i>	1:3000	P. R. Chitnis, Iowa State University, Ames, USA
anti-AtpB	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die $\beta$ -Untereinheit AtpB der $F_0F_1$ -ATP-Synthase aus <i>Synechocystis</i>	1:5000	K.D. Irrgang, Beuth-Hochschule für Technik, Berlin, GER
anti-GSA	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die Glutamat-1-Semialdehyde-Aminotransferase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1:5000	Grimm <i>et al.</i> (1989)
anti-GluTR	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die Glutamyl-tRNA-Reduktase (HEMA1) aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1:100	Hedtke <i>et al.</i> (2007)
anti-CHLD	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die Mg-Chelatase-Untereinheit CHLD aus <i>Pisum sativum</i>	1:500	T. Yong-sheng, Huazhong Agricultural University, Wuhan, CHI
anti-CHLH	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die Mg-Chelatase-Untereinheit CHLH aus <i>Pisum sativum</i>	1:500	T. Yong-sheng, Huazhong Agricultural University, Wuhan, CHI
anti-GUN4	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen GUN4 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1:2000	Peter & Grimm (2009)
anti-ChlM	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen MgProto-Methyltransferase aus <i>Nicotiana tabacum</i>	1:1500	Alawady & Grimm (2005)
anti-Crd1/CHL27	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper, gerichtet gegen den N-terminalen Rest der Mg-Protoporphyrin-IX-monomethylester-Cyclase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1:2000	Agrisera AB (Vännäs, SWE)
anti-CGL78/YCF54	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen ein Peptid von CGL78/YCF54 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1:1000	Agrisera AB (Vännäs, SWE)
anti-LCAA/YCF54	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen das YCF54-Homolog LCAA aus	1:3000	M. Hansson, Carlsberg Laboratory, Copenhagen, DEN

	<i>Hordeum vulgare</i>		
anti-POR	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen die Protochlorophyllid-Oxidoreduktase aus <i>Triticum aestivum</i>	1:500	Agrisera AB (Vännäs, SWE)
anti-LHCA1	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen ein Peptid von LHCA1 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1:5000	Agrisera AB (Vännäs, SWE)
anti-LHCB1	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen konservierte Sequenzmotive von Angehörigen der LHCB1-Familie (inkl. aus <i>Arabidopsis thaliana</i> )	1:2500	Agrisera AB (Vännäs, SWE)
anti-NTRC	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen ein Peptid von NTRC aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1:1000	Prof. E. Rintamäki, Universität von Turku, FIN
anti-LIL3.1	Kaninchen-IgG, polyklonaler Primärantikörper gerichtet gegen LIL3.1, ein Vertreter der <i>Light-harvesting-like</i> Proteinfamilie aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	1:500	Ass.-Prof. R. Tanaka, Hokkaido Universität, JPN
anti-Kaninchen-HRP-Konjugat	Ziegen-IgG, Sekundärantikörper gerichtet gegen invariable Ketten von Kaninchen-IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)	1:20.000	Sigma-Aldrich (München, GER)

### 2.1.3 Plasmide

In der Tabelle 2 sind alle Plasmide aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet und zur Herstellung weiterer Konstrukte herangezogen wurden.

**Tabelle 2:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide. (Fortsetzung auf der folgenden Seite)

Plasmid	Bezeichnung/Verwendung	Herkunft/Referenz
pJET1.2 <i>blunt Cloning Vector</i>	<i>blunt</i> -Klonierungsvektor; Amp <sup>R</sup> ; 2974 bp; Klonierung von PCR-Produkten	Thermo Scientific (Schwerte, GER)
pQE-80L	Amp <sup>R</sup> ; 4751 bp; Proteinexpression	Qiagen (Hilden, GER)
pET28a	Km <sup>R</sup> ; 5356 bp; Proteinexpression	Merck (Darmstadt, GER)
pDONR <sup>TM</sup> 221	Km <sup>R</sup> ; 4762 bp; <i>Entry</i> -Vektor	Life Technologies (Darmstadt,

	für Gateway®-Klonierung	GER)
pGL1	Binärer Vektor, abgeleitet von pGPTV- <i>bar</i> ; ohne GUS-Gen; zusätzlich 35S CaMV Promotor und <i>multiple cloning site</i> eingefügt; stabile Transformation von Pflanzen	Becker <i>et al.</i> (1992)
pXCS-HA-Strep	Binärer Vektor, BASTA <sup>R</sup> ; 5332 bp; stabile Transformation von Pflanzen	Witte <i>et al.</i> (2004)
pOpOff2(Hyg)	<i>Destination</i> -Vektor für Gateway®-Klonierung, Hyg <sup>R</sup> ; stabile Transformation von Pflanzen	CSIRO-Institut (Clayton South, AUS) Wielopolska <i>et al.</i> (2005)

#### 2.1.4 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der folgenden Tabelle 3 aufgeführt. Die Restriktionsendonukleasen wurden von Thermo Scientific (Schwerte, GER) oder New England Biolabs (Frankfurt/Main, GER) bezogen und unter Verwendung der vom Hersteller angegebenen Puffer eingesetzt, sodass sie nicht gesondert aufgelistet und beschrieben sind.

**Tabelle 3:** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller
<i>DreamTaq</i>	Thermo Scientific (Schwerte, GER)
<i>Gateway® BP Clonase® II enzyme mix</i>	Life Technologies (Darmstadt, GER)
<i>Gateway® LR Clonase® II enzyme mix</i>	Life Technologies (Darmstadt, GER)
Lysozym	Serva (Heidelberg, GER)
Proteinase K	Life Technologies (Darmstadt, GER)
<i>RevertAid Reverse Transcriptase</i>	Thermo Scientific (Schwerte, GER)
<i>Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase</i>	New England Biolabs (Frankfurt/Main, GER)
<i>Ribo Lock RNase Inhibitor</i>	Thermo Scientific (Schwerte, GER)
RNase A	AppliChem (Darmstadt, GER)
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific (Schwerte, GER)

#### 2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Die für die durchgeführten Amplifikationen erforderlichen, synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München, GER), Eurofins MWG Operon

(Ebersberg, GER) und Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies (Darmstadt, GER) bezogen. Eine Auflistung aller verwendeten Oligonukleotide mit Informationen zu deren Verwendung findet sich im Anhang (Tabelle 29, Tabelle 30 und Tabelle 31). Das Design der Primer wurde computerunterstützt mittels PerlPrimer v1.1.18 (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) und Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) durchgeführt. Die gelieferten, lyophilisierten Primer wurden in der Regel zur weiteren Verwendung nach Herstellerangaben auf eine Arbeitskonzentration von 10 µM mit *A. bidest* verdünnt. Für quantitative Transkriptanalysen (s. 2.2.2.15) wurde die Primer-Stammlösung von 100 µM verwendet. Darüber hinaus wurden Primersequenzen nahe des 3'-Endes der kodierenden Region des entsprechenden Gens gewählt, um auszuschließen, dass unvollständige Transkripte amplifiziert werden. Ferner galten folgende Kriterien: Nukleotidlänge 18 bis 27 bp, Schmelztemperatur von 60 °C, Amplikonlänge zwischen 50 und 150 bp (möglichst intronumspannend) und GC-Gehalt von 35 bis 65 %. Die Spezifität der Primer wurde unter Verwendung des BLAST N-Algorithmus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kontrolliert.

## 2.1.6 Kits und sonstige Materialien

### 2.1.6.1 Kits

Die Tabelle 4 listet die in dieser Arbeit verwendeten Kits.

**Tabelle 4:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits.

Bezeichnung des Kits	Hersteller/Lieferant
<i>CloneJET PCR Cloning Kit</i>	Thermo Scientific, Schwerte, GER
<i>MSB<sup>®</sup> Spin PCRapace</i>	STRATEC Molecular (Berlin, GER)
<i>innuPREP PCRpure Kit</i>	Analytik Jena (Jena, GER)
<i>Invisorb<sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit</i>	STRATEC Molecular (Berlin, GER)
<i>innuPREP Gel Extraction Kit</i>	Analytik Jena (Jena, GER)
<i>TRI<sup>sure</sup><sup>TM</sup></i>	Bioline (Luckenwalde, GER)
<i>innuPREP Plant RNA Kits</i>	Analytik Jena (Jena, GER)
<i>InviTrap<sup>®</sup> Spin Plant RNA Mini Kit</i>	STRATEC Molecular (Berlin, GER)
<i>BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	Life Technologies (Darmstadt, GER)
<i>Bio-Rad Silver Stain</i>	Bio-Rad (München, GER)

### 2.1.6.2 Größenstandards

Die für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Nukleinsäuren eingesetzten Größenstandards zur Abschätzung der molekularen Größe sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Größenstandards mit definierten Molekulargewichten.

Standard	Hersteller
Protein-Standard	
<i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i>	Thermo Scientific (Schwerte, GER)
<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	Thermo Scientific (Schwerte, GER)
<i>PageRuler Unstained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific (Schwerte, GER)
DNA-Standard	
<i>GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder</i>	Thermo Scientific (Schwerte, GER)
<i>GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder</i>	Thermo Scientific (Schwerte, GER)

### 2.1.6.3 Sonstige Materialien

In der Tabelle 6 sind alle weiteren sonstigen Materialien wie Membranen, Filter und Säulen aufgelistet, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

**Tabelle 6:** Liste verwendeter Filter, Membranen und Säulen. (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Bezeichnung	Hersteller
Membranen und Porenfilter	
Amersham <sup>TM</sup> Protran <sup>TM</sup> Premium NC Nitrozellulose Membranes	GE Healthcare, Freiburg, GER
Amersham <sup>TM</sup> Hybond <sup>TM</sup> -C	GE Healthcare, Freiburg, GER
Optitran <sup>®</sup> BA-S85	Schleicher & Schuell (Dassel, GER)
Gel-Blotting-Papiere BF 2 (460 x 570 mm)	Th. Geyer (Renningen, GER)
Miracloth	Merck (Darmstadt, GER)
Roti-Labo Spritzenfilter (0,22 und 0,45 µm Porengröße)	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Amicon <sup>®</sup> Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheit 10K und 30K	Millipore (Darmstadt, GER)
Sonstige Materialien	
Glasperlen 0,1/0,25-0,5 mm	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden, GER)

### 2.1.7 Technische Geräte

Alle verwendeten technischen Laborgeräte sind in der Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7:** Technische Laborgeräte die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen. (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Gerät	Gerätetyp/Hersteller
Anzuchtschrank	MobyLux GroBank BB-XXL/3, CLF Plant Climatics
Autoklav	Varioklav R, H+P
CCD-Camera (Detektion von Chemilumineszenzsignalen)	stella 3200, raytest
Elektroporator	MicroPulser™, Bio-Rad
Fluoreszenzspektralphotometer	Hitachi F4500
Geldokumentationssystem	Alphamager, Biozym
Gelelektrophoreseapparatur für DNA und RNA	Mini-Sub Cell GT System und Wide Mini-Sub Cell GT System, Bio-Rad
Geltrockner	Unigeldryer 3545, Montréal Biotech Inc.
Heizblock	BioShake iQ, Quantifoil Instruments Thermomixer compact, Eppendorf
Homogenisator (Heidolph-Rührer)	RZR 2020, Heidolph
Homogenisator (Mixer)	Blendor 8011E, Waring
HPLC	Agilent 1100, Agilent Technologies Agilent 1290, Agilent Technologies
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	CLSM TCS SP2 AOBS, Leica
Laborwaagen	SI-203 und SI-2002, Denver Instruments CPA225D, Sartorius
Lichtstärkemessgerät	LI-250 Light Meter, Li-Cor Bioscience
Magnetrührer	RCT standard und basic, IKA®
pH-Meter	SevenCompact™ S220, Mettler Toledo
Phytokammer	PGV 36, Conviron
Schüttelinkubator	innova 4000, New Brunswick Scientific Ecotron, Infors HT Minitron, Infors HT
Schüttler	Orbital Shaker 7-0031, neoLab RM10W 30V, CAT
SDS-PAGE-System	Mini-PROTEAN 3, Bio-Rad SE 250 MightySmall, Hoefer

---

Spannungsquellen	PowerPac™ Basic Power Supply, Bio-Rad
Spektrophotometer	UV-2401PC, Shimadzu Ultrospec 3300 pro, GE Healthcare NanoDrop 2000 UV/Vis, Thermo Scientific
Sterilwerkbank	Lamin Air®, Heraeus, Hanau Lamina Airflow Workstation, Integra Biosciences
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf Biofuge pica, Heraeus Biofuge fresco, Heraeus
Thermocycler	T3, TPersonal und Tgradient, Biometra
Ultraschall-Homogenisator	SONOPLUS HD2070 mit Sonotrode MS73, Bandelin
UV-Leuchte	UVA-1, M&S
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Western-Blot-Apparaturen	Trans-Blot® SD Cell, Bio-Rad Fastblot B43, Biometra
Zellmühle	MM300 und MM2000, Retsch
Zentrifugen	Avanti® J-26 XP und J-30 I, Beckmann Coulter (Rotor JLA 16.250 und JS 24) ROTINA 35R und 38R, Hettich

---

### 2.1.8 Datenbanken und Software

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Datenbanken und Computerprogramme für *in silico* Arbeiten und Analysen, wie z. B. Homologie- und Sequenzvergleiche, Sequenzinformationen oder Vorhersage von Proteineigenschaften, herangezogen. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software *Microsoft Office 2007* (Excel, Word; Microsoft Corp., Redmond, USA). Die Erstellung und Bearbeitung von Grafiken wurde mit den Programmen *SigmaPlot® 11.0* (Systat Software Inc., San Jose, USA), *Adobe Photoshop* Version 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) und *ChemBioDraw Ultra 12.0* (CambridgeSoft Corp., Cambridge, USA) durchgeführt. Die Erstellung von Plasmidkarten und *in silico*-Klonierungen erfolgten mit der Software *Vector NTI® Advance 10* (Invitrogen, Darmstadt, GER). An geeigneter Stelle werden die vom Hersteller mitgelieferten Programme aufgeführt, die mit zur Auswertung genutzt wurden. Die folgende Tabelle 8 listet alle weiteren Programme und Datenbanken.



**Tabelle 8:** Auflistung der verwendeten Datenbanken und Software. (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Software	Internetadresse/Referenz	Anwendung
BioEdit	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html</a> Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA	DNA-Sequenzanalyse
ChloroP 1.1 Server	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/</a>	Tool zur <i>in silico</i> Vorhersage von Transitpeptiden
Chloroplast Phenomics	<a href="http://plastid.msu.edu/">http://plastid.msu.edu/</a> Lu <i>et al.</i> (2011)	Datenbank phänotypisch charakterisierter Mutanten von <i>Arabidopsis thaliana</i>
ClustalW2	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a> Larkin <i>et al.</i> (2007)	Multiple Sequenzvergleiche
CyanoBase	<a href="http://genome.microbedb.jp/cyanobase">http://genome.microbedb.jp/cyanobase</a> Nakao <i>et al.</i> (2010)	Sequenzdatenbank für Cyanobakterien
DFCI	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tobacco">http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tobacco</a>	Datenbank zu EST-Informationen von <i>Nicotiana tabacum</i>
DoubleDigest	<a href="http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/">http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/</a>	Datenbank zur Auswahl der Puffer von Restriktionsendonukleasen
eFP Browser	<a href="http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi">http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi</a>	Ressource für Genexpressionsanalysen für <i>Arabidopsis thaliana</i>
LIGATION CALCULATOR	<a href="http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html">http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html</a>	Tool zur Berechnung von Ligationsparametern
NCBI-BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> Altschul <i>et al.</i> (1990)	Homologiesuche für DNA- und Protein-Sequenzen
Pfam	<a href="http://pfam.sanger.ac.uk/">http://pfam.sanger.ac.uk/</a>	Datenbank von Proteinen und Proteinfamilien
Phyre2	<a href="http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index">http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index</a> Kelley & Sternberg (2009)	<i>in silico</i> Strukturvorhersage für Proteine
Primer3	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/</a>	Tool zum Design von Primern für PCR
PerlPrimer v1.1.18	<a href="http://perlprimer.sourceforge.net/">http://perlprimer.sourceforge.net/</a>	Tool zum Design von Primern für PCR
Protein Molecular Weight Calculator	<a href="http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm">http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm</a>	Berechnung des theoretischen Molekulargewichts von Proteinen
SignalP 4.1 Server	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>	Tool zur <i>in silico</i> Vorhersage von Signalpeptiden

SIGNAL T-DNA Express	<a href="http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress">http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress</a>	Tool zur Suche von T-DNA-Insertionslinien von <i>Arabidopsis thaliana</i>
TAIR	<a href="http://www.arabidopsis.org/">http://www.arabidopsis.org/</a>	Datenbank zu Sequenzinformationen von <i>Arabidopsis thaliana</i>
TargetP 1.1 Server	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a>	Tool zur <i>in silico</i> Vorhersage von subzellulären Lokalisationen

## 2.1.9 Biologisches Material

### 2.1.9.1 Mikroorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Klonierungen und Proteinexpressionen folgende Stämme des Enterobakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet (Tabelle 9):

**Tabelle 9:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Herkunft/Referenz
DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1 deoR</i>	Klonierungen	Invitrogen (Karlsruhe, GER)
DB3.1	F <sup>-</sup> <i>gyrA462 endA1</i> Δ( <i>sr1-recA</i> ) <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ) <i>supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (SmR) <i>xyl-5 λ- leu mtl1</i>	Vermehrung von Suizidvektoren (z.B. pOpOff2(Hyg))	Invitrogen (Karlsruhe, GER)
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ) λ(DE3)	Proteinexpression	Invitrogen (Karlsruhe, GER)
Rosetta <sup>TM</sup> (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ) λ(DE3) pRARE (Cm <sup>R</sup> )	Proteinexpression	Merck (Darmstadt, GER)

Zur stabilen Transformation von *Arabidopsis* und *Nicotiana tabacum* wurden die *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme GV2260, EHA105 und GV3101::pMP90RK verwendet. Neben ihren Ti-(Helfer)Plasmiden (pGV2260 (McBride & Summerfelt, 1990); pMP90RK (Koncz & Schell, 1986); pEHA105 (Hood *et al.*, 1993)) sind diese Stämme durch den chromosomalen Hintergrund des C58-Stammes und folglich der Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Rifampicin (Hellens *et al.*, 2000) charakterisiert. Zur Kultivierung wurden die Stämme in YEB-Medium mit 100 µg ml<sup>-1</sup> Rifampicin angezogen. Der GV3101::pMP90RK-

Stamm wurde zusätzlich durch die Zugabe von 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Kanamycin, 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Gentamycin und 75  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Carbenicillin selektiert.

In dieser Arbeit dienten im Weiteren Cyanobakterien des Stammes *Synechocystis* sp. PCC6803 als Untersuchungsobjekt. Hierbei wurde ein Wildtyp-Stamm ohne phototaktische Motilität verwendet (Kaneko *et al.*, 1996b; Tajima *et al.*, 2011), welcher von Prof. Ikeuchi (Universität Tokio, Japan) bezogen wurde. Darüber hinaus stand zu Beginn dieser Arbeit die *ycf54*-Mutante zur Verfügung, die im Labor von Prof. Teruo Ogawa (Japan) durch Insertion einer Erythromycin-Resistenzgen-Kassette in den genomischen Locus *slr1780* (*ycf54*) über artifiziell erzeugte Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen BamHI und HindIII generiert wurde. Im Laufe dieser Arbeit wurden im Zuge einer Kooperation weitere, unten aufgeführte Mutanten analysiert, die von Dr. Thomas Wallner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Wilde (Justus-Liebig-Universität Gießen) generiert wurden.

#### ***ycf54*/FLAG-*ycf54***

Dr. Thomas Wallner (2011, AG Wilde) transformierte *Synechocystis ycf54*-Zellen mit dem Plasmid pSK9-FLAG-*ycf54*, welches die ektopische Expression des Ycf54-Proteins als N-terminale Fusion mit einem 3xFLAG-tag unter Kontrolle des *petJ*-Promotors ermöglicht.

#### **WT/FLAG-*ycf54***

Dr. Thomas Wallner (2011, AG Wilde) transformierte *Synechocystis* Wildtyp-Zellen mit dem Plasmid pSK9-FLAG-*ycf54*, welches die ektopische Expression des Ycf54-Proteins als N-terminale Fusion mit einem 3xFLAG-tag unter Kontrolle des *petJ*-Promotors ermöglicht.

#### **2.1.9.2 Pflanzen**

Als weitere Untersuchungsobjekte dienten höhere Pflanzen, wie die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* L. HEYNH., Ökotyp Columbia (Col-0)) sowie Tabak (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN (SNN)). Zu Beginn dieser Arbeit stand die *Nicotiana tabacum* LCAA-Antisense-Mutante zur Verfügung, die mithilfe einer cDNA-Bibliothek von Dr. Wolfgang Lein und Mitarbeiter (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm) generiert wurde. Darüber hinaus wurden Untersuchungen an photoautotrophen Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis* durchgeführt, die freundlicherweise von Prof. Dr. Thomas Roitsch (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt wurden.

### 2.1.10 Medien

In diesem Kapitel sind alle Medien aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. In der Regel wurden Lösungen und Puffer mit *A. bidest* angesetzt. Wenn ein anderes Lösungsmittel verwendet wurde, ist dies gesondert vermerkt. Ebenso wird gesondert darauf hingewiesen, wenn Lösungen sterilfiltriert oder autoklaviert wurden.

#### 2.1.10.1 Medien und Lösungen zur Kultivierung von Bakterien

Tabelle 10 listet die Medien und Lösungen, die zur Anzucht von *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) verwendet wurden.

**Tabelle 10:** Medien und Lösungen zur Anzucht von *E. coli* und *A. tumefaciens*.

Medium	Zusammensetzung
„Low salt“-LB (autoklaviert)	10 g l <sup>-1</sup> Bacto-Trypton; 5 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt; 5 g l <sup>-1</sup> NaCl; pH 7,5 mit 1 M HCl 15 g l <sup>-1</sup> Agar (AppliChem) für die Herstellung von Festmedium
YEB (autoklaviert)	5 g l <sup>-1</sup> Trypton; 1 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt; 5 g l <sup>-1</sup> Saccharose; 0,49 g l <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O; pH 7,2 mit 1 M HCl 15 g l <sup>-1</sup> Agar (AppliChem) für die Herstellung von Festmedium
SOC (sterilfiltriert)	20 g l <sup>-1</sup> Trypton; 5 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt; 0,5 g l <sup>-1</sup> NaCl; 0,185 g l <sup>-1</sup> KCl; 3,92 g l <sup>-1</sup> Glukose; pH 7,0 mit 1 M HCl

Die Kultivierung von *Synechocystis* erfolgte standardmäßig in BG-11-Medium (Rippka *et al.*, 1979). Für die Versuchsansätze unter Kupfermangel wurde dem BG-11-Medium jedoch kein CuSO<sub>4</sub> beigemengt. Für Stickstoffmangel-Experimente wurde das entsprechende -N BG-11-Medium verwendet.

**Tabelle 11:** Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen zur Anzucht von *Synechocystis*. Für die Induktion des Kupfermangels wurde ein Spurenelemente-Mix ohne CuSO<sub>4</sub> eingesetzt.

Medium/Lösung	Zusammensetzung
100x BG-11 (autoklaviert)	149,58 g l <sup>-1</sup> NaNO <sub>3</sub> ; 7,5 g l <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O; 3,6 g l <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O; 0,6 g l <sup>-1</sup> Zitronensäure; 0,56 ml l <sup>-1</sup> 0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0; 5 ml l <sup>-1</sup> 1 M TES, pH 8,0
50x -N BG-11 (autoklaviert)	3,75 g l <sup>-1</sup> MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O; 1,8 g l <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O; 0,3 g l <sup>-1</sup> Zitronensäure; 0,28 ml l <sup>-1</sup> 0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA, pH 8,0; 2,5 ml l <sup>-1</sup> 1 M TES, pH 8,0
Spurenelemente-Mix (sterilfiltriert)	2,86 g l <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 1,81 g l <sup>-1</sup> MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O; 0,22 g l <sup>-1</sup> ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O; 0,39 g l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O; 0,079 g l <sup>-1</sup> CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O; 0,049 g l <sup>-1</sup> Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O
1x BG-11 (autoklaviert)	10 ml l <sup>-1</sup> 100x BG-11; 1 ml l <sup>-1</sup> Spurenelemente-Mix; 30 mg l <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 3 H <sub>2</sub> O; 20 mg l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 6 mg l <sup>-1</sup> Ammonium Eisen(III)-Citrat 7,5 g l <sup>-1</sup> BD Bacto™ Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, GER) für die Herstellung von Festmedium
1x -N BG-11 (autoklaviert)	20 ml l <sup>-1</sup> 50x -N BG-11; 1 ml l <sup>-1</sup> Spurenelemente-Mix; 30 mg l <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 3 H <sub>2</sub> O; 20 mg l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 6 mg l <sup>-1</sup> Ammonium Eisen(III)-Citrat 7,5 g l <sup>-1</sup> BD Bacto™ Agar (BD, Heidelberg, GER) für die Herstellung von Festmedium

### 2.1.10.2 Medien und Lösungen zur Kultivierung von Pflanzen

Die Tabelle 12 listet die Medien und Puffer, die zur Anzucht von Pflanzen in Sterilkultur sowie für phototrophe Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis* verwendet wurden.

**Tabelle 12:** Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer zur Anzucht von Pflanzen und phototropen Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis*. (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Medium	Zusammensetzung
MS	4,43 g l <sup>-1</sup> Murashige und Skoog Medium mit Vitaminen (Duchefa, Haarlem, NL) pH 5,7 mit 0,1 M KOH 8 g l <sup>-1</sup> Difco™ Agar (BD, Heidelberg, GER) für die Herstellung von Festmedium
2MS	4,4 g l <sup>-1</sup> Murashige und Skoog Medium mit Vitaminen (Duchefa, Haarlem, NL); 20 g l <sup>-1</sup> Saccharose pH 5,7 mit 0,1 M KOH 8 g l <sup>-1</sup> Difco™ Agar (BD, Heidelberg, GER) für die Herstellung von Festmedium

Carbonatpuffer (autoklaviert)	55,3 g l <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 160,2 g l <sup>-1</sup> KHCO <sub>3</sub>
PASK-Medium	3,2 g l <sup>-1</sup> Gamborg B5 Medium mit Vitaminen (G0210; Duchefa, Haarlem, NL); 1 mg l <sup>-1</sup> 2,4-Dichlorphenoxyssäure (Duchefa, Haarlem, NL) pH 5,7 mit 1 M NaOH

### 2.1.10.3 Medienzusätze

Häufig verwendete Medienzusätze sind in der Tabelle 13 aufgeführt. Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert und dem entsprechenden, autoklavierten Medium in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt, sobald das Medium auf weniger als 50 °C abgekühlt war. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -20 °C.

**Tabelle 13:** Häufig verwendete Medienzusätze. Stammlösungen wurden in den angegebenen Konzentrationen und Lösungsmitteln angesetzt und sterilfiltriert. Die Arbeitskonzentrationen variierten in Einzelfällen, worauf an entsprechender Stelle hingewiesen wird.  
(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Substanz	Funktion	Hersteller	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration
Ampicillin	Antibiotikum	AppliChem	100 mg ml <sup>-1</sup>	<i>A. bidest</i>	100 µg ml <sup>-1</sup>
Chloramphenicol	Antibiotikum	Duchefa	34 mg ml <sup>-1</sup>	Ethanol	34 µg ml <sup>-1</sup>
Erythromycin	Antibiotikum	Sigma-Aldrich	20 mg ml <sup>-1</sup>	Ethanol	20 µg ml <sup>-1</sup>
Hygromycin B	Antibiotikum	Carl Roth	50 mg ml <sup>-1</sup>	<i>A. bidest</i>	35 µg ml <sup>-1</sup>
Kanamycin	Antibiotikum	Carl Roth	50 mg ml <sup>-1</sup>	<i>A. bidest</i>	50 µg ml <sup>-1</sup>
Rifampicin	Antibiotikum	Duchefa	25 mg ml <sup>-1</sup>	DMSO	100 µg ml <sup>-1</sup>
Streptomycin	Antibiotikum	Duchefa	20 mg ml <sup>-1</sup>	<i>A. bidest</i>	10 mg ml <sup>-1</sup>
IPTG	Induktion der Genexpression	Duchefa	1 M	<i>A. bidest</i>	1 mM
ALA	Intermediat der Chlorophyllbiosynthese	Merck	1 M	<i>A. bidest</i> *	1-5 mM
Proto	Intermediat der Chlorophyllbiosynthese	Frontier Scientific	9,6 mM	DMSO	50 µM
MgProto	Intermediat der Chlorophyllbiosynthese	Frontier Scientific	2,2 mM	Methanol	20 µM

Hämin (oxidiertes Häm)	Intermediat der Tetrapyrrol-biosynthese	Sigma	11 mM	DMSO	11 µM
Acifluorfen	Inhibitor der Chlorophyll-biosynthese	Sigma	200 mM	Aceton	200 µM
Gabaculin	Inhibitor der Chlorophyll-biosynthese	Fluka	10 mM	<i>A. bidest</i>	50 µM
2,2'-Dipyridyl	Inhibitor der Chlorophyll-biosynthese	Sigma-Aldrich	2 M	Ethanol	2 mM

\* abgepuffert mit 1M Tris/KOH, pH 7,2, um ein Ansäuern des Mediums zu verhindern

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine und physiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte standardmäßig aerob in LB-Medium (s. Tabelle 10) bei 37 °C (Sambrook & Russell, 2001) als Flüssigkultur auf einem Schüttelinkubator bei 225 rpm oder als Festkultur im Anzuchtschrank. Einzelne Stämme erforderten zur Kultivierung den Einsatz von Antibiotika, damit zusätzlich eingebrachte Plasmide im Verlauf der Anzucht nicht verloren gehen.

Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* (s. Abschnitt 2.1.9.1) wurden auf YEB-Medium (s. Tabelle 10) mit 100 µg ml<sup>-1</sup> Rifampicin sowie weiteren erforderlichen Antibiotika bei 30 °C kultiviert. Die Anzucht von Flüssigkulturen erfolgte unter zusätzlichem, permanentem Schütteln bei einer Frequenz von 225 min<sup>-1</sup>.

#### 2.2.1.2 Kultivierung von *Synechocystis*

Die Kultivierung von *Synechocystis* zur Stammhaltung erfolgte in Zellkulturschalen auf 0,75 % (w/v) Bacto<sup>TM</sup>-Agar in BG11-Medium (Rippka *et al.*, 1979) mit den zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks notwendigen Antibiotika (s. Abschnitt 2.1.9.1 und Tabelle 11).

*Synechocystis*-Flüssigkulturen wurden photoautotroph in gepuffertem (5 mM TES, pH 8,0) BG11-Medium mit der ggfs. erforderlichen Antibiotikazugabe in Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler (125 min<sup>-1</sup>) angezogen und bei 28°C und konstanter Belichtung (Sylvania GroLux FHO24W/T5/GRO) von <20 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Schwachlicht) kultiviert. Für Kupfermangelversuche wurde dem Spurenelementemix kein Kupfersulfat beigemengt. Zur Anzucht von Zellen unter Stickstoffentzug wurden die Zellen zunächst wie gewohnt bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Nachdem die Zellen durch Zentrifugation (4.000 rpm, 10 min, RT) sedimentiert wurden, erfolgte das Entfernen von enthaltenem Stickstoff durch dreimaliges Waschen mit BG-11 -N-Medium. Im Anschluss wurden die Kulturen in BG-11 -N-Medium resuspendiert und auf einen Chl *a*-Gehalt von 3 µg ml<sup>-1</sup> eingestellt.

Für Versuche, die größere Volumina einer Hauptkultur erforderten, wurden diese mit Zellen einer Vorkultur inokuliert, sodass die anfängliche Zelldichte bei OD<sub>750nm</sub> = 0,1 lag. Die Zellernte erfolgte stets in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD<sub>750nm</sub> = 0,7-0,9.

### 2.2.1.3 Kultivierung von Pflanzen

Die Anzucht von *Arabidopsis* erfolgte gewöhnlich auf einem Gemisch aus zwei Teilen Einheitserde Typ GS90 (Gebr. Patzer, Sinntal-Jossa, GER) und einem Teil Vermiculit (Dämmstoff-Fabrik Klein, Bubenheim, GER). Zusätzlich zur Bekämpfung von Bodenschädlingen wurde der Erde Lizetan<sup>®</sup> (Bayer CropScience, Langenfeld, GER) beigemengt. Nachdem die ausgebrachten Samen für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert wurden, erfolgte die Kultivierung in Anzuchtschränken unter Kurztagbedingungen (10 h Licht, 14 h Dunkelheit) bei einer Temperatur von 23 °C und mittleren Lichtintensitäten von 90 bis 100 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Diese Anzuchtbedingungen werden nachfolgend als Standard- oder Normalbedingungen bezeichnet.

Photoautotrophe Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis* wurden in speziellen Doppelstock-Erlenmeyerkolben (Roitsch & Sinha, 2002) in AT-Medium (Tabelle 12) angezogen. Eine Carbonatpuffer-Lösung im unteren der zwei Kolben sichert eine 2 %ige CO<sub>2</sub>-Atmosphäre als Kohlenstoffquelle ab (Meyer & Spiteller, 1997). Die Kulturen wurden bei einer Temperatur von 23 °C und konstanter Belichtung (Sylvania GroLux FHO24W/T5/GRO) von etwa 100 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> kontinuierlich geschüttelt (90 rpm; Minitron, Infors HT). Alle zwei



Wochen erfolgte eine Subkultivierung der Hälfte der Zellsuspension mit frischem AT-Medium.

Die Kultivierung von *Nicotiana tabacum* erfolgte üblicherweise auf Einheitserde Typ T (Gebr. Patzer, Sinntal-Jossa, GER) in Phytokammern unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bei einer Temperatur von 23 °C und 130  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Abweichende Tages- und Lichtbedingungen für einzelne Experimente sind an entsprechender Stelle gesondert vermerkt.

#### **2.2.1.4 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkultur**

Die Zelldichte bzw. optische Dichte (OD) von Flüssigkulturen wurde mithilfe des Spektrophotometers Ultrospec 3300 pro (GE Healthcare, Freiburg, GER) bei einer Wellenlänge von 600 nm für *E. coli* bzw. 750 nm für *Synechocystis* in Einmal-Küvetten bestimmt. Als Referenz diente das jeweilige Anzuchtmedium.

#### **2.2.1.5 Spektrophotometrische Messungen von *Synechocystis*-Kulturen**

Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis* WT- und *ycf54*-Flüssigkulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ( $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,7$  bis  $0,9$ ), wurden mithilfe des UV-2401PC Spektrophotometers (Shimadzu) in Berlin und Gießen aufgezeichnet. Nach einer *Baseline*-Kalibrierung gegen Luft erfolgte die Messung in Einmal-Küvetten in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 750 nm. Destilliertes Wasser diente hierbei als Null-Abgleich. Für die Analyse stark streuender Proben verwendete Dr. Thomas Wallner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Annegret Wilde (Justus-Liebig-Universität Gießen) eine integrierende Sphäre nach Ulbricht (1920). Die Abbildungen stammen zum Teil von Messungen, die Dr. Thomas Wallner durchführte und sind als solche gekennzeichnet.

#### **2.2.1.6 77K Fluoreszenzemissionsspektroskopie ganzer Zellen von *Synechocystis***

Zur Aufzeichnung von 77K-Fluoreszenzemissionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis* wurden Flüssigkulturen unter Verwendung gleicher Chlorophyllgehalte ( $\text{OD}_{680\text{nm}}$ ) mit 70 % (v/v) Glycerol (finale Konzentration) versetzt. Die Spektren wurden in Glasröhrchen in flüssigem Stickstoff mithilfe des Fluoreszenz-Spektrophotometers Modell F-7000 (Hitachi, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm (20 nm Schlitzbreite) bestimmt. Zuletzt wurden die Spektren auf den Emissionspeak des Photosystem I bei 725 nm normalisiert. Die

Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Heiko Lokstein (Universität Glasgow) durchgeführt.

#### 2.2.1.7 Wachstumsanalyse von *Synechocystis*-Kulturen

Das Wachstumsverhalten von Wildtyp und *ycf54<sup>-</sup>* wurde in Zellkulturplatten untersucht, die für 14 Tage mit kontinuierlichem Starklicht ( $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Normallicht ( $40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Schwachlicht ( $12 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) belichtet wurden. Dazu wurden die Vertiefungen der 24-well-Platten jeweils mit 1 ml 0,75 % (w/v) Agar in BG11-Medium gleichmäßig bedeckt. Die Nährböden für die *ycf54<sup>-</sup>*-Mutante enthielten zusätzlich  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  Erythromycin. Die über 4 Tage unter Schwachlicht angezogene Vorkultur wurde auf eine  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  von 0,4 verdünnt, die einer Zelldichte von ungefähr  $10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  entspricht. Ausgehend von dieser Stammkultur wurde eine Verdünnungsreihe mit vier Verdünnungsstufen von  $10^6$  bis  $10^3$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  hergestellt. Von den vorbereiteten Verdünnungsstufen wurde je ein 7  $\mu\text{l}$ -Tropfen auf die Agar-Oberfläche der entsprechenden Vertiefung der Zellkulturplatte gegeben.

#### 2.2.1.8 Zellernte, Zellaufschluss und Fraktionierung von *Synechocystis*-Zellen

Für die Zellernte wurden *Synechocystis*-Flüssigkulturen zentrifugiert (4.800 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Thylakoid-Puffer (50 mM Hepes/NaOH, pH 7; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 50 mM EDTA, pH 8; 10 % (v/v) Glycerol) in einem Volumenverhältnis von 20:1 (Kulturvolumen:Puffervolumen) resuspendiert. Nach dem Mischen der Zellsuspension mit einem Volumen Glasperlen (0,1/0,25-0,5 mm) erfolgte der Aufschluss des Ansatzes in einer Zelmühle des Typs Retsch MM2000 ( $40 \text{s}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 15 min). Nicht aufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer und Glasperlen wurden durch Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  und 3.000 rpm für 5 min abgetrennt. Der Überstand wurde entnommen und als Gesamtzellextrakt aufbewahrt.

Bei gewünschter Fraktionierung wurde der Gesamtzellextrakt, bzw. ein Teil davon, durch eine hochtourige Zentrifugation (13.000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min) in lösliche Zellbestandteile sowie in die unlösliche Membranfraktion (vornehmlich Thylakoide) aufgetrennt. Der so erhaltene Überstand konnte umgehend anschließenden Analysen unterzogen oder eingefroren werden, wohingegen das Thylakoidpellet zunächst in vierfachem Volumen Thylakoid-Puffer resuspendiert werden musste.

### 2.2.1.9 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes von *Synechocystis*

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes ganzer Zellen von *Synechocystis* erfolgte nach Lichtenthaler (1987) durch Dr. Thomas Wallner in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. Annegret Wilde (Justus-Liebig-Universität Gießen). Hierfür wurde 1 ml der Flüssigkultur zentrifugiert (6.000 rpm, 4°C, 5 min) und der Überstand gründlich entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml 90 %igem Methanol resuspendiert und für 30 min im Dunkeln bei 4°C inkubiert. An die Extraktion schloss sich eine Zentrifugation des Ansatzes bei 13.000 rpm und 4°C für 5 min an. Der Überstand wurde bei 665 nm photometrisch vermessen. Für den Null-Abgleich wurde 90 % (v/v) Methanol eingesetzt. Anhand der nachfolgenden Formel konnte der Chlorophyllgehalt der Probe berechnet werden:

$$\text{Chlorophyll } [\mu\text{g ml}^{-1}] = \frac{A_{665\text{nm}} \cdot 1000}{79,38} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.2.1.10 Bestimmung des Phycocyanin- und Allophycocyaningehaltes von *Synechocystis*

Zur Bestimmung des Phycocyanin- und Allophycocyaningehaltes nach Tandeau de Marsac & Houmard (1988) wurden durch Dr. Thomas Wallner in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. Annegret Wilde (Justus-Liebig-Universität Gießen) 100 µl des Gesamtzellextraktes (s. Abschnitt 2.2.1.8) bei 13.000 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert und 50 µl des gewonnenen Überstandes (lösliche Fraktion) mit *A. bidest* auf 1 ml aufgefüllt. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 620 und 650 nm am Spektrophotometer. Zur Berechnung des Phycocyanin- und Allophycocyaningehaltes wurden die nachfolgenden Formeln herangezogen:

$$\text{Phycocyanin } [\text{mg ml}^{-1}] = \frac{A_{620\text{nm}} - 0,7 \cdot A_{650\text{nm}}}{7,38} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Allophycocyanin } [\text{mg ml}^{-1}] = \frac{A_{650\text{nm}} - 0,19 \cdot A_{620\text{nm}}}{5,65} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für die Normalisierung der Phycocyanin- und Allophycocyaningehalte wurde die Gesamtmenge an Protein der Gesamtzellextrakte (s. Abschnitt 2.2.3.4) verwendet.

Im Weiteren wurden für die Stickstoffmangel-Experimente relative Phycocyaningehalte in Anlehnung an die Methode von Collier & Grossman (1992) bestimmt. Hierzu wurden Wildtyp- und *ycf54*-Flüssigkulturen wie unter 2.2.1.2 beschrieben auf einen

Chlorophyllgehalt von  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  eingestellt und unter Stickstoffmangel angezogen. Kulturproben für die Kinetik der Phycobilisomen-Degradation wurden anschließend vor sowie nach einer 8-minütigen Inkubation bei  $75^\circ\text{C}$  spektrophotometrisch bei 620 und 750 nm vermessen. Die Berechnung des relativen Phycocyanningehaltes erfolgte mittels nachfolgender Formel:

$$\text{relativer Phycocyanningehalt [ml}^{-1}\text{]} = (A_{620\text{nm}} - A_{750\text{nm}} (\text{nicht erhitzt})) - (A_{620\text{nm}} - A_{750\text{nm}} (\text{erhitzt}))$$

#### 2.2.1.11 Bestimmung des Pigmentgehaltes von Pflanzen

Etwa 50 bis 100 mg an gefrorenem Blattmaterial wurde homogenisiert und in 500  $\mu\text{l}$  eisgekühltem Aceton:0,1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  (9:1, v/v) resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  wurde das Pellet drei weitere Male bis zur vollständigen Entfärbung extrahiert und die Überstände vereint. Die Analyse der Pigmente erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) durch das Agilent 1100-System (Agilent Technologies) mithilfe eines Diodenarray-Detektors. Chlorophylle und Carotinoide wurden auf einer ProntoSil 200-3-C30-Säule (4,6 x 250 mm;  $3,0 \mu\text{m}$ ,  $21^\circ\text{C}$ ; Bischoff Chromatography) mit einer Flussrate von  $1 \text{ ml min}^{-1}$  aufgetrennt. Die Elution von der Säule erfolgte über einen Gradienten von Lösung A (90 % (v/v) Acetonitril; 10 % (v/v) Wasser; 0,1 % (v/v) Triethylamin) und Lösung B (100 % (v/v) Ethylacetat) anhand des Schemas aus Tabelle 14.

**Tabelle 14:** Gradient zur Trennung und Elution von Pigmenten mittels HPLC.

Zeit [min]	Lösung A [%]	Lösung B [%]
0	100	0
3	70	30
20	0	100
24	0	100
21,1	100	0
28	100	0

Die Detektion erfolgte bei der Anregungswellenlänge von 440 nm. Authentische Standards (Frontier Scientific, Logan, USA) dienten der Identifizierung und Quantifizierung der Pigmente.

### 2.2.1.12 Bestimmung der Porphyringehalte

Porphyrin- und Mg-Porphyrine wurden von sedimentierten Zellen einer 10-ml-*Synechocystis*-Flüssigkultur oder von 50 bis 100 mg gefrorenem, homogenisiertem Blattmaterial unter Verwendung von 250 µl Extraktionsmix (Aceton:Methanol:0,1 N NH<sub>4</sub>OH, 10:9:1, v/v/v) extrahiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei -20 °C schloss sich eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min und 4 °C an. Der Überstand wurde überführt und die Extraktionsprozedur zwei- bis dreimal wiederholt. Die Porphyrine der vereinten Überstände wurden mittels des HPLC Agilent 1100-Systems (Agilent Technologies) auf einer Poroshell 120 EC-C18-Säule (3,0 x 150 mm; 2,7 µm 21 °C; Agilent) mit einer Flussrate von 0,55 ml min<sup>-1</sup> aufgetrennt. Die Elution von ProtoIX erfolgte isokratisch mit 90 % (v/v) Lösung A (90 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) 1 M Ammoniumacetat, pH 7,0) und 10 % (v/v) Lösung B (100 % (v/v) Ethylacetat). Mg-Porphyrine wurden isokratisch mit 100 % (v/v) Lösung A eluiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 405 und 637 nm für ProtoIX bzw. von 420 und 600 nm für Mg-Porphyrine (Peakbreite 2,31 Hz; PMT *gain* 17). Authentische Standards (Frontier Scientific, Logan, USA) dienten der Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Porphyrine.

Für die Bestimmung von Fe-Chelatase-Aktivitäten war die zusätzliche Quantifizierung von Zn-ProtoIX erforderlich. Entsprechende Extrakte (2.2.5.5) wurden mittels des HPLC Agilent 1100-Systems (Agilent Technologies) auf einer Nova-Pak-C18-Säule (4 µm; 3,9 x 150 mm; 20 °C; Waters) mit einer Flussrate von 1,2 ml min<sup>-1</sup> aufgetrennt. Die Elution von der Säule erfolgte über einen Gradienten von Lösung A (80 % (v/v) *A. bidestris*; 10 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Ammoniumacetat, pH 5,2) und Lösung B (90 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Ammoniumacetat, pH 5,2) anhand des Schemas aus Tabelle 15.

**Tabelle 15:** Gradient zur Trennung und Elution von Zn-ProtoIX mittels HPLC

Zeit [min]	Lösung A [%]	Lösung B [%]
0	0	100
4	0	100
4,5	100	0
7	100	0
7,5	0	100
12	0	100

Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 416 und 589 nm (Peakbreite 0,2 nm; PMT gain 17). Authentische Standards (Frontier Scientific, Logan, USA) dienten der Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Porphyrine.

### 2.2.1.13 Bestimmung des Protochlid- und Chlid-Gehaltes

Zur Bestimmung von Protochlid- und Chlid-Gehalten wurden entweder Zellen einer 10-ml-*Synechocystis*-Flüssigkultur sedimentiert (4.800 rpm, 10 min, 4 °C) oder 50 bis 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Bei dunkel-adaptierten Pflanzen war es erforderlich, das Blattmaterial zuvor unter Grünlicht durch ein 2-minütiges Erhitzen in Wasserdampf zu fixieren (Koski & Smith, 1948), um eine lichtabhängige Umwandlung von Protochlid in Chlid durch die Protochlorophyllid-Oxidoreduktase zu verhindern. Die Extraktion erfolgte mit 500 µl eisgekühltem Aceton:0,1 M NH<sub>4</sub>OH (9:1, v/v) für 20 min bei -20 °C. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min bei 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktionsprozedur wurde zwei- bis dreimal wiederholt und die Überstände zusammengeführt. Die Analyse der Chlorophyllvorstufen wurde mittels des HPLC Agilent 1290-Systems (Agilent Technologies) auf einer Nova-Pak-C18-Säule (4 µm; 3,9 x 150 mm; 21 °C; Waters) mit einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup> durchgeführt. Die Elution von Protochlid und Chlid erfolgte mit einem Gradienten von Lösung A (90 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Ammoniumacetat, pH 7,0) und Lösung B (80 % (v/v) Methanol; 20 % (v/v) Aceton) nach dem Schema aus Tabelle 16.

**Tabelle 16:** Gradient zur Trennung und Elution von Protochlid und Chlid mittels HPLC.

Zeit [min]	Lösung A [%]	Lösung B [%]
0	100	0
7,5	70	30
8	0	100
13	0	100
13,1	100	0

Die Detektion erfolgte bei der Anregungswellenlänge von 435 nm und der Emissionswellenlänge von 644 nm (Peakbreite 4,63 nm; PMT gain 18) sowie der Absorption bei 430 nm. Auch hierbei dienten authentische Standards (Frontier Scientific, Logan, USA) der Identifizierung und Quantifizierung der Chlorophyllvorstufen.

#### 2.2.1.14 Bestimmung des Gehaltes von nicht kovalent gebundenem Häm

Nicht kovalent gebundenes Häm wurde aus 50 bis 100 mg Blattmaterial extrahiert, das zunächst im flüssigen Stickstoff homogenisiert wurde. Zum vollständigen Entfernen des enthaltenen Chlorophylls schlossen sich mehrere Extraktionsschritte mit eiskaltem, basischem Aceton (Aceton:0,1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 9:1, v/v) sowie Zentrifugationsschritte (13.000 rpm; 15 min, 4 °C) an. Das Pellet wurde nachfolgend in 200  $\mu\text{l}$  Häm-Extraktionslösung (Aceton: $\text{HCl}_{\text{konz}}$ :DMSO, 100:5:20, v/v/v) resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde der Extrakt bei 13.000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand umgehend mittels HPLC analysiert. Extrahiertes, nicht kovalent gebundenes Häm wurde im HPLC Agilent 1290-System (Agilent Technologies) auf einer Poroshell 120 EC-C18-Säule (3,0 x 100 mm; 2,7  $\mu\text{m}$  30 °C; Agilent) mit einer Flussrate von 0,8 ml  $\text{min}^{-1}$  aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von Lösung A (100 % (v/v) *A. bidest*, pH 3,2) und Lösung B (100 % (v/v) Methanol) nach dem Schema aus Tabelle 17.

**Tabelle 17:** Gradient zur Trennung und Elution von nicht kovalent gebundenem Häm mittels HPLC.

Zeit [min]	Lösung A [%]	Lösung B [%]
0	30	70
8	30	70
8,1	0	100
12	0	100
12,1	30	70
15	30	700

Mithilfe eines Diodenarray-Detektors wurde nicht kovalent gebundenes Häm bei einer Anregungswellenlänge von 398 nm detektiert und unter Verwendung von authentischen Standards (Frontier Scientific, Logan, USA) quantifiziert.

### 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.2.1 Isolation von genomischer DNA aus *Synechocystis*

Die Isolation von genomischer DNA aus *Synechocystis* erfolgte nach Franche & Damerval (1988) durch Dr. Thomas Wallner in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. Annegret Wilde (Justus-Liebig-Universität Gießen).

#### **2.2.2.2 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzen**

Genomische DNA aus Pflanzen wurde nach dem Protokoll von Weigel & Glazebrook (2002) isoliert. Hierfür wurden 50 bis 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und homogenisiert. Die Extraktion erfolgte mit 400 µl DNA-Extraktionspuffer (200 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % (w/v) SDS). Nach anschließender Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, RT) wurde der gewonnene Überstand zur Fällung mit 400 µl Isopropanol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde das entstandene DNA-Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl *A. bidest* resuspendiert.

#### **2.2.2.3 Plasmidisolation aus *E. coli* nach alkalischer Lyse**

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook & Russell, 2001). Hierfür wurden 2 ml einer Vorkultur bei 10.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg ml<sup>-1</sup> RNase A) resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 5 min erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 (200 mM NaOH; 10 g l<sup>-1</sup> SDS) bei RT für 5 min. Anschließend wurden zur Präzipitation von im Extrakt enthaltenen Proteinen 300 µl gekühlter Puffer P3 (3 M K-Acetat, pH 5,5) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und auf Eis für 10 min inkubiert. Nach darauffolgender Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der proteinfreie Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl Isopropanol versetzt. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurde die im Überstand enthaltene DNA durch anschließende Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min, 4 °C) gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und zuletzt in 50 µl *A. bidest* resuspendiert.

Sofern sich eine DNA-Sequenzierung anschloss, wurde die isolierte Plasmid-DNA zusätzlich, wie im Abschnitt 2.2.2.5 beschrieben, aufgereinigt. Ebenso konnte auf diese Weise gereinigte Plasmid-DNA für die Transformation elektrokompenter Zellen (s. Abschnitt 2.2.2.17) eingesetzt werden.

#### **2.2.2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten**

Zur Klonierung von Genabschnitten oder zum Nachweis genetischer Veränderungen, wurden DNA-Fragmente mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis *et al.* (1986))



amplifiziert. Im Fall von Klonierungsstrategien kam die *Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase* (NEB, Frankfurt/Main, GER) und für alle weiteren PCR-Reaktionen die *DreamTaq Green DNA Polymerase* (Thermo Scientific, Schwerte, GER) zum Einsatz. Beide Enzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet. Als Template für die PCR-Reaktionen dienten genomische DNA, Plasmid-DNA sowie aufgeschlossenes Zellmaterial (Kolonie-PCR).

#### **2.2.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Einzelne Klonierungsschritte oder Sequenzierungen erforderten die Aufreinigung von DNA-Fragmenten. In Lösung befindliche DNA wurde mithilfe des Kits *MSB<sup>®</sup> Spin PCRapace* (STRATEC Molecular, Berlin, GER) oder *innuPREP PCRpure* (Analytik Jena, Jena, GER) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem DNA-Agarosegel wurde der *Invisorb<sup>®</sup> Spin DNA Extraction Kit* (STRATEC Molecular, Berlin, GER) oder der *innuPREP Gel Extraction Kit* (Analytik Jena, Jena, GER) verwendet. Die Durchführung erfolgte ebenso den Angaben des Herstellers.

#### **2.2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA in wässriger Lösung erfolgte mithilfe des *NanoDrop 2000 UV/Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei wurden jeweils 1 µl der zu vermessenden Probe eingesetzt. Die Reinheit der Lösung wurde zusätzlich anhand des Quotienten von OD<sub>260nm</sub> zu OD<sub>280nm</sub> überprüft, wobei optimale Werte zwischen 1,8 und 2,0 lagen. *A. bidest* diente bei den Messungen als Referenz.

#### **2.2.2.7 DNA-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden gemäß ihrer Größe in 0,8 bis 1,5 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose der Firma AppliChem (Darmstadt, GER) sowie TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA, pH 8,0) verwendet. Die Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht wurde durch das Beimengen von 0,7 µg ml<sup>-1</sup> DNA-interkalierendem Ethidiumbromid (AppliChem) ermöglicht. Die DNA-Fragmente wurden zuvor mit 0,2 Vol Ladepuffer (6x *DNA Loading Dye*, Thermo Scientific, Schwerte, GER) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook & Russell (2001) bei einer Spannung von 80 bis 120 V. Zur Dokumentation der Auftrennung wurde das

AlphaImager-Geldokumentationssystem (Biozym, Hessisch Oldendorf, GER) herangezogen. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurden Größenstandards der Firma Thermo Scientific (*GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder* und *GeneRuler<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder*; Schwerte, GER) verwendet.

#### **2.2.2.8 Konstruktion von Plasmidvektoren und Modifikation von Nukleinsäuren**

Im Zuge dieser Arbeit wurden zur Generierung von rekombinanten DNA-Molekülen unterschiedliche Modifikationen an DNA-Fragmenten und Plasmiden durchgeführt. Die hierbei vorrangig eingesetzten Enzyme waren Restriktionsendonukleasen und DNA-Ligasen, die von den Firmen NEB (Frankfurt/Main, GER) und Thermo Scientific (Schwerte, GER) bezogen wurden. Restriktionen unter Einsatz von 5 U des entsprechenden Enzyms wurden sowohl zur Analyse (1 µg DNA) als auch für Klonierungsexperimente (5 µg DNA) vorgenommen. Die Durchführungen erfolgten gemäß den Herstellerangaben mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern.

Im Weiteren wurden zur Erzeugung von stabilen Transformanten von Pflanzen sowie zur Expression rekombinanter Proteine im Vorfeld verschiedene Vektoren konstruiert. Als Template für die Amplifikation der Zielsequenz dienten genomische DNA und cDNA. Die erforderlichen Primer wurden entsprechend so designt, dass Ergänzungen an dem 5'- und 3'-Ende um entsprechende Restriktionsschnittstellen oder Rekombinationssequenzen die weitere Klonierung in den Zielvektor erleichterten. Im speziellen Fall der Gateway<sup>®</sup>-Technologie (Life Technologies, Darmstadt, GER) wurden Rekombinationssequenzen des Bakteriophagen λ, sogenannte *att*-Sequenzen, genutzt, um die DNA-Fragmente über homologe Rekombination in den Zielvektor einzufügen. Unter Verwendung des *Gateway<sup>®</sup> BP Clonase<sup>®</sup> II Enzyme mix* (Life Technologies, Darmstadt, GER) und des *Gateway<sup>®</sup> LR Clonase<sup>®</sup> II Enzyme mix* (Life Technologies, Darmstadt, GER) wurde die Klonierung dem Herstellerprotokoll entsprechend durchgeführt. Als *Entry*-Vektor wurde pDONR<sup>TM</sup>221 (Life Technologies, Darmstadt, GER) und als Destinationsvektor pOpOff(2)Hyg (CSIRO, Clayton South, AUS) verwendet. Die Zwischenklonierung in den pJET1.2 Vektor (Thermo Scientific, Schwerte, GER) wurde mithilfe des *CloneJET PCR Cloning Kits* (Thermo Scientific, Schwerte, GER) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Generell erfolgte im Anschluss an die Zwischenklonierungen der amplifizierten DNA-Fragmente in spezielle Plasmide (s. Tabelle 2) nach durchgeführter Kolonie-PCR (s. Abschnitt 2.2.2.4) stets eine DNA-Sequenzierung (s. Abschnitt 2.2.2.9) zur Verifizierung der DNA-Sequenz. Geeignete Klone

mit der Insert-DNA wurden schließlich für die Plasmidisolierung (s. Abschnitt 2.2.2.3) zur Klonierung des DNA-Fragmentes in den Zielvektor ausgewählt. Für die hierbei erforderliche Ligation wurden standardmäßig 25 ng linearisierte Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 1:3 mit der generierten Insert-DNA eingesetzt. Die Ligation erfolgte stets in 10 µl Reaktionsansätzen mit 1 U T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific, Schwerte, GER) für 2 h bei RT. Zuletzt schloss sich die Transformation des gesamten Ligationsansatzes mit *E. coli*-Zellen an (s. Abschnitt 2.2.2.16).

#### **2.2.2.9 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgt mittels der Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977) durch die Firma SMB Services in Molecular Biology GmbH (Berlin, GER). Für die Reaktion wurde das *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies, Darmstadt, GER) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Als Template für die Sequenzierungsreaktion dienten entweder 350 ng Plasmid-DNA oder 50 ng eines PCR-Produktes. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer sind im Anhang in der Tabelle 29 aufgeführt. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt.

#### **2.2.2.10 Isolation von RNA aus *Synechocystis***

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus *Synechocystis* mit TRIsure™ (Bioline, Luckenwalde, GER) wurden etwa 25 ml einer *Synechocystis*-Flüssigkultur der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{750nm} = 0,7-0,9$ ) in einem 50 ml mit Eis gefülltem Reaktionsgefäß zentrifugiert ( $6000 \times g$ , 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 1 ml TRIsure™ resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde der Extrakt für 15 min bei 65 °C erhitzt, wobei zur besseren Lyse alle 2 bis 3 min die Probe geschwenkt wurde. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Extrakt zunächst für 30 sec geschüttelt und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch anschließende Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min bei 4 °C. Die in der oberen, wässrigen Phase enthaltene RNA wurde mit 0,7 Vol Isopropanol über Nacht bei -20 °C gefällt. Zur Präzipitation der RNA wurde am Folgetag die Probe bei 13.000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 75 % gekühltem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und zuletzt in 30 µl *A. bidest* resuspendiert. Die Konzentration wurde wie im Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben ermittelt. Zusätzlich wurde die Qualität der isolierten RNA (1 µg) per denaturierender RNA-Gelelektrophorese überprüft (s. Abschnitt 2.2.2.12).

#### 2.2.2.11 Isolation von RNA aus Pflanzen

Die Isolation von Gesamt-RNA aus etwa 100 mg Blattmaterial bzw. Zellmaterial (bei Suspensionskulturen), das unter Verwendung von flüssigem Stickstoff homogenisiert wurde, erfolgte unter Verwendung von TRIsure™ (Bioline, Luckenwalde, GER), des *innuPREP Plant RNA Kits* (Analytik Jena, Jena, GER) oder des *InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kits* (STRATEC Molecular, Berlin, GER). Die Durchführung der Extraktion erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers. Ebenso wie die aus *Synechocystis* isolierte RNA wurden auch die pflanzlichen RNA-Proben mittels des *NanoDrop 2000 UV/Vis Spectrophotometer* (Thermo Scientific) quantifiziert sowie deren Qualität per denaturierender RNA-Gelelektrophorese kontrolliert.

#### 2.2.2.12 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Zur Quantitäts- und Qualitätskontrolle von isolierter Gesamt-RNA wurde eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Vorbereitend wurden alle zu verwendenden Materialien mit *RNase Exitus* (AppliChem, Darmstadt, GER) behandelt. Jeweils 1 µg der RNA wurden mit einem gleichen Volumen an 2x RNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, GER) vermengt und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Als Puffer für die denaturierende RNA-Gelelektrophorese diente 1x MEN (20 mM MOPS; 5 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA, pH 7,0). Das RNA-Gel wurde mit 1,3 % (w/v) Agarose, 7 % (v/v) Formaldehyd in 1x MEN-Puffer angesetzt. Der Lauf erfolgte bei einer Spannung von 80 V.

#### 2.2.2.13 Synthese von cDNA mittels Reverser Transkription

Zur Vorbereitung für die cDNA-Synthese wurden 5 µg RNA mit *DNase I* (Thermo Scientific, Schwerte, GER) in einem 20 µl-Reaktionsansatz gemäß den Herstellerangaben behandelt. Die vollständige Beseitigung von DNA-Kontaminationen wurden mittels PCR bestätigt. Für die Synthese von cDNA mithilfe der *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific, Schwerte, GER) wurden 2 µg der *DNase I*-behandelten RNA sowie 5 µM Oligo-dT-Primer eingesetzt. Die Reaktion erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die synthetisierte cDNA konnte direkt für weitere Klonierungen von kodierenden Genabschnitten oder zur (semi)quantitativen Transkriptanalyse eingesetzt werden.

#### 2.2.2.14 Quantifizierung von Transkripten mittels semiquantitativer PCR

Semiquantitative PCR-Analysen von cDNA wurden mithilfe der *DreamTaq Green DNA-Polymerase* (Thermo Scientific, Schwerte, GER) sowie den entsprechend in der Tabelle 31 gekennzeichneten Primern (Endkonzentration 0,5  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Das PCR-Amplikon umfasste wenn möglich 200 bis 600 bp und ein Intron. Das Reaktionsvolumen betrug 20  $\mu\text{l}$ , wobei 1  $\mu\text{l}$  der 10-fach verdünnten cDNA als Template eingesetzt wurden. Ansonsten wurden die PCR-Bedingungen den Angaben des Herstellers der DNA-Polymerase gewählt, wobei die PCR-Zyklen der einzelnen Transkripte empirisch ermittelt wurden. Durch parallele Amplifikationen von dem stabil exprimierten Referenzgen als interner Standard (Tubulin, TUA5) wurde der Einsatz identischer cDNA-Konzentrationen der verwendeten Proben kontrolliert. Sofern sich cDNA-Konzentrationen von Referenzgen-Transkripten von zu vergleichenden Proben unterschieden, wurde eine Anpassung durch entsprechende Verdünnung mit *A. bidest* vorgenommen.

#### 2.2.2.15 Quantifizierung von Transkripten mittels quantitativer *Real-Time*-PCR

Die Quantifizierung von Transkripten mittels quantitativer *Real-Time*-PCR (qPCR) erfolgte entweder in optischen 96-Well-Platten mit dem *Bio-Rad CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System* (Bio-Rad) oder in optischen 384-Well-Platten mit dem *LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System* (Roche Diagnostics) unter Verwendung des *SensiMix<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> No-ROX Kits* (Bioline, Luckenwalde, GER). Das finale Volumen der Reaktionsansätze für das *Bio-Rad CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System* betrug 10  $\mu\text{l}$ , wobei 1  $\mu\text{l}$  an cDNA-Template mit einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt wurde. Hierbei wurde folgendes Temperaturprofil genutzt: 95 °C für 10 min, 45 Zyklen bei 95 °C, 60 °C und 72 °C für jeweils 15 sec. Die Schmelzkurve wurde nach dem 45. Zyklus durch allmähliches Erhitzen von 65 °C auf 95 °C mit einer Geschwindigkeit von 0,5 °C s<sup>-1</sup> aufgezeichnet. Für das *LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System* wurden 5  $\mu\text{l}$ -Reaktionsansätze verwendet mit je 0,5  $\mu\text{l}$  an 1:200 verdünnter cDNA. Das *LightCycler<sup>®</sup>*-Protokoll begann mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 10 min (4,8 °C s<sup>-1</sup>), gefolgt von 45 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 sec (4,8 °C s<sup>-1</sup>), einem *Annealing*-Schritt bei 55 °C für 20 sec (2,5 °C s<sup>-1</sup>) und einem Elongationsschritt bei 72 °C für 15 sec (4,8 °C s<sup>-1</sup>). Abschließend erfolgte noch ein Denaturierungsschritt für 5 sec bei 95 °C (4,8 °C s<sup>-1</sup>). Die Aufzeichnung der Schmelzkurve erfolgte nach der finalen Denaturierung durch den kontinuierlichen Temperaturanstieg von 65 °C auf 95 °C mit einer anfänglichen

Geschwindigkeit von  $2,5\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$  über eine Minute und anschließend  $0,11\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$ . Zuletzt schloss sich eine Kühlung auf  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 sec ( $2,5\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$ ) an.

Die genspezifischen Primer wurden unter den für qPCR erforderlichen Kriterien wie im Abschnitt 2.1.5 beschrieben designt und in beiden Systemen in einer finalen Konzentration von 250 nM eingesetzt. Die Bezeichnungen und Sequenzen der einzelnen Primer sind in der Tabelle 30 im Anhang aufgeführt. Referenzgene, die konstant exprimiert werden und zur Normierung der Expressionsanalysen herangezogen wurden, sind hierbei gesondert vermerkt.

Die Durchführung der Genexpressionsanalyse mit dem *Bio-Rad CFX96<sup>TM</sup> Real-Time System* erfolgte mit der vom Hersteller mitgelieferten Software unter Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008) anhand von zwei Referenzgenen. Bei dem *LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System* wurde für jedes Primerpaar eine Standardkurve parallel im Lauf der zu analysierenden Probe mitgeführt. Jede Standardkurve beinhaltete vier verschiedene Verdünnungen (1:40, 1:200, 1:1000, 1:5000) der Wildtyp-cDNA und diente der Berechnung der relativen Transkriptlevel. Für die Analyse der Daten wurde die *LightCycler<sup>®</sup> 480 Software* Version 1.5.1 (Roche Diagnostics) sowie die *REST-384 Software* (<http://www.gene-quantification.de/rest-384.html>; Pfaffl *et al.* (2002)) verwendet. Der Zyklus bei dem die Fluoreszenz der Probe erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (*Crossing Point*, Cp) wurde mithilfe der „*Second Derivative Maximum*“-Methode kalkuliert. Insgesamt wurden zwei bis drei technische Replikate je biologisches Replikat analysiert.

#### **2.2.2.16 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen und deren Transformation**

Zur Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden 400 ml LB-Medium mit den erforderlichen Antibiotika (s. Tabelle 9 und Tabelle 13) mit 4 ml einer Vorkultur inokuliert und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,5 bis 0,6 angezogen. Durch Zentrifugation (5.000 rpm, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wurden die Zellen geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml sterilem, eisgekühltem 100 mM  $\text{MgCl}_2$  resuspendiert und für etwa 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4.000 rpm für 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml sterilem, eisgekühltem, mit 15 % Glycerol versetztem 100 mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert. Zuletzt wurde die Suspension in Einzelportionen zu je 100  $\mu\text{l}$  aliquotiert, umgehend in flüssigen Stickstoff schockgefroren und dann bis zur Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte schließlich nach Standardmethoden von Sambrook & Russell (2001). Die aliquotierten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und dann mit 0,5 µl bis 1 µl einer Plasmid-DNA-Lösung oder einem Ligationsansatz gemischt und für etwa 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Hitzeschock-Inkubation für 1,5 min im Wasserbad bei 42 °C und umgehender Abkühlung für 1 min auf Eis wurde 1 ml SOC-Medium zu dem Transformationsansatz hinzugegeben. Zur Regeneration wurden die Zellen für 45 bis 60 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Zuletzt erfolgte der Ausstrich eines 50 bis 150 µl Aliquots auf festem LB-Medium mit den entsprechenden Selektionsmarkern und eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.

#### 2.2.2.17 Herstellung elektrisch kompetenter Agrobakterien und deren Transformation

Die Herstellung von elektrisch kompetenten Agrobakterien erfolgte weitgehend dem Protokoll von Wang (2006). Alle verwendeten Medien enthielten Rifampicin und für den Stamm GV3101::pMP90RK zusätzlich Kanamycin, Gentamycin und Carbenicillin. Vorerst wurde frisch eine YEB-Agarplatte mit Bakterien eines Glycerolstocks des gewünschten *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes beimpft und bei 30 °C für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurde eine Vorkultur von einer Einzelkolonie dieser Agarplatte angezogen. Im weiteren Verlauf wurden 200 ml YEB-Medium mit den erforderlichen Antibiotika mit 2 ml der Vorkultur frisch beimpft und bei 28 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,5 bis 2,0 angezogen. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4.000 × g für 20 min bei 4 °C. Die pelletierten Zellen wurden in 1 Volumen sterilem, eisgekühltem *A. bidestris* resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach viermaliger Wiederholung des Waschschriffs wurden die Zellen final in 2 ml sterilem, eisgekühltem 10 %igen Glycerol resuspendiert. Aliquotierte Einzelportionen zu je 40 µl wurden sofort in flüssigem Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot von elektro-kompetenten Agrobakterien-Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 ng Binärvektor-Plasmid-DNA gemischt. Der Transformationsansatz wurde umgehend in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit einem Plattenabstand von 1 mm überführt und in die Elektroporationsapparatur eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte mit dem *Bio-Rad MicroPulser<sup>TM</sup>* (Bio-Rad) bei einer Spannung von 2200 V nach Angaben des Herstellers. Die transformierten Zellen wurden sofort in 400 µl vorgewärmtes YEB-Medium aufgenommen und für etwa 3 h bei 28 °C geschüttelt. Nach der regenerierenden

Inkubation wurde ein Aliquot auf festem YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 2 bis 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### 2.2.2.18 Stabile Transformation von *Arabidopsis*

Die stabile Transformation von *Arabidopsis* erfolgte in abgewandelter Form dem Protokoll von Clough & Bent (1998). Gesunde *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen wurden im Langtag zur Blütenbildung angezogen, wobei stets die ersten Knospen abgeschnitten wurden, um die Proliferation von Sekundärknospen anzuregen. Vorbereitend wurde eine 4 ml-Kultur des gewünschten *Agrobacterium tumefaciens*-Stamms, der das Zielgen auf einem binären Vektor trägt, bei 28 °C für etwa 2 Tage angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5.500 rpm, 10 min, RT) pelletiert, mit Leitungswasser zweimal gewaschen und in Inokulationsmedium (5 % (w/v) Saccharose, 0,05 % (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA)) resuspendiert, sodass die finale OD<sub>600nm</sub> etwa 0,8 betrug. Zuletzt wurden die noch geschlossenen Blütenknospen mithilfe einer Pipette mit je einem Tropfen der Bakteriensuspension benetzt. Die Pflanzen wurden hiernach für 16 bis 24 h mit einer Haube abgedeckt, um erhöhte Luftfeuchtigkeit aufrechtzuerhalten, und an einen schattigen Ort transferiert. Diese Prozedur wurde zur Erhöhung der Transformationsrate nach Bildung neuer Blütenknospen bis zu dreimal wiederholt. Das nach Samenreifung gewonnene Saatgut wurde abhängig von dem Selektionsmarker des transformierten binären Vektors entweder auf festem MS-Medium mit 35 µg ml<sup>-1</sup> Hygromycin B ausgebracht oder auf Erde ausgesät und nach etwa 14 Tagen nach der Keimung mit einer 0,1 %igen BASTA<sup>TM</sup>-Lösung (Bayer Crop Science, Monheim, GER) besprüht. Zusätzlich zur Selektion auf Antibiotika- oder Herbizid-Resistenz erfolgte der Transgennachweis mittels PCR von isolierter genomischer DNA.

### 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.3.1 Proteinextraktion aus Pflanzen

Für die Proteinextraktion wurden etwa 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit 500 µl Extraktionspuffer (12 % (w/v) Saccharose; 1 % (w/v) SDS; 56 mM DTT; 56 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 2 mM EDTA, pH 8,0) vermischt. Das Extraktionsgemisch wurde für 10 min bei 75 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, RT). Der so gewonnene Proteinextrakt konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert oder direkt elektrophoretisch auf SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt werden. War eine genauere Quantifizierung der Proteinproben für immunologische Nachweise erforderlich,



so wurde eine Proteinbestimmung mit BCA nach erfolgter TCA-Fällung durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.3.2).

### **2.2.3.2 TCA-Fällung und Proteinbestimmung mit BCA**

Für die Proteinbestimmung mithilfe des *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kits* (Pierce, Rockford, USA) war eine vorhergehende Fällung der Proteinextrakte mit Trichloressigsäure (TCA) notwendig, um störende Detergenzien und Denaturierungsmittel aus dem Extraktionspuffer zu entfernen. Hierzu wurden 100 µl des Proteinextrakts (s. Abschnitt 2.2.3.1) mit 1 ml vorgekühlter, 10 %iger (w/v) TCA versetzt und für 10 min auf Eis zur Fällung der Proteine inkubiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die präzipitierten Proteine pelletiert und im Weiteren in 200 µl 0,1 M NaOH resuspendiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der gefällten Proben sowie der Standards mit Rinderserumalbumin (BSA; 100-1000 µg ml<sup>-1</sup>) zur Kalibrierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Als Referenz diente eine parallel angesetzte Probe mit 0,1 M NaOH.

### **2.2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde herangezogen, um die enthaltene Proteinmenge solcher Proben bzw. Extrakte zu ermitteln, die entweder aufgereinigte, rekombinante Proteine enthielten oder als Bezugsgröße bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten dienten. Eine vorhergehende Proteinpräzipitation war hierbei nicht erforderlich. Es wurden kleine Volumina von 5 bis 10 µl der zu vermessenden Probe mit 1 ml Bradford-Lösung (0,01 % (w/v) *Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue R250* (Serva, Heidelberg, GER); 4,75 % (v/v) Ethanol; 8,5 % (v/v) Phosphorsäure) vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die anschließende spektrophotometrische Vermessung erfolgte am *Ultrospec 3300 pro* (GE Healthcare) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Referenz wurde *A. bidest* eingesetzt und zur Kalibrierung eine Eichreihe mit BSA unterschiedlicher Konzentration (2 bis 25 µg ml<sup>-1</sup>) herangezogen.

### **2.2.3.4 DOC/TCA-Fällung und Proteinbestimmung nach Lowry**

Der Proteinbestimmung von *Synechocystis*-Zellen und -Zellextrakten nach Lowry *et al.* (1951) ging zunächst eine DOC/TCA-Fällung der Proben voraus (Bensadoun & Weinstein, 1976). Dazu wurden definierte Volumina der zu vermessenden Proben (250 µl bei ganzen Zellen, 2-10 µl bei Gesamtzellextrakten) mit *A. bidest* auf 1 ml aufgefüllt und mit 25 µl 2 %

(w/v) Natriumdesoxycholat (DOC) versetzt. Nach Mischen wurden jeweils 30 µl 40 %ige (w/v) Trichloressigsäure (TCA) hinzu gegeben und die Proteine bei kurzer Inkubation auf Eis gefällt. Anschließend wurde für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die präzipitierten Proteine wurden in 1 ml frisch angesetzter Lösung C (0,01 % K-Na-Tartrat, 0,005 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 M NaOH, 2 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz (1:2 mit *A. bidest* verdünnt) wurde sofort gründlich gemischt. Der 45-minütigen Inkubation bei RT im Dunkeln schloss sich die photometrische Messung bei 750 nm an. Als Referenz diente ein parallel angesetzter Nullwert mit *A. bidest*. Anhand einer Eichgeraden mit BSA – entsprechende Proben unterschiedlicher Konzentrationen ( $10\text{-}80 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) wurden parallel vermessen – erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentrationen.

#### 2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte in dieser Arbeit herkömmlich durch diskontinuierliche SDS-PAGE mit dem Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli (1970). Abhängig von den Molekulargewichten der aufzutrennenden Proteine wurden 7,5-, 12- oder 15 %ige SDS-Polyacrylamidgele hergestellt (s. Tabelle 18) und in Apparaturen der Modelle Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad) bzw. SE 250 MightySmall (Hoefer) eingespannt. Zur Probenvorbereitung wurden Proteinextrakte aus *Synechocystis* mit 4x Probenpuffer (250 mM Tris/HCl (pH 6,8); 40 % (w/v) Glycerol; 8 % (w/v) SDS; 0,4 M DTT; 0,4 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt, bei 50°C für 30 min im Heizblock inkubiert und dann kurz zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde schließlich auf das SDS-Gel aufgetragen. Proteinextrakte aus Pflanzen konnten nach 5-minütiger Denaturierung bei 95 °C direkt auf das SDS-Gel aufgetragen werden. Proben rekombinanter Proteinen wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung in der Regel mit 2x Probenpuffer (0,09 M Tris/HCL, pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 M DTT) versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Für den Lauf der Proteine in den SDS-Gelen nach dem Laemmli-System wurden die Proteine zunächst bei einer angelegten Spannung von 80 V im Sammelgel konzentriert und bei 120-150 V im Trenngel aufgetrennt. Zur Größenidentifizierung der aufgetrennten Proteine wurden Protein-Marker (Thermo Scientific, Schwerte, GER) auf jedem Gel mitgeführt.

Im Anschluss an den Gellauf wurden die Proteine entweder einer Silber- oder Coomassie-Färbung unterzogen (s. 2.2.3.6 bzw. 2.2.3.7) oder elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Western-Blot s. 2.2.3.8)

#### System nach Laemmli (1970):

Trenngel-Puffer (4x):	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgel-Puffer (4x):	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
AA/BisAA-Stammlösung:	30 % AA/BisAA (29:1)
SDS-Stammlösung:	10 % (w/v) SDS
APS-Stammlösung:	10 % (w/v) APS
Elektrophorese-Puffer:	25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

**Tabelle 18:** Zusammensetzung der am häufigsten verwendeten SDS-Polyacrylamidgele. Für zwei kleine Gele wurden 10 ml Trenngel und 3 ml Sammelgel angesetzt.

	7,5 %iges Trenngel	12 %iges Trenngel	15 %iges Trenngel	4 %iges Sammelgel
Trenngel-Puffer (4x)	2,5 ml			-
Sammelgel-Puffer (4x)	-	-	-	0,75 ml
AA/BisAA-Stammlösung	2,5 ml	4,0 ml	5,0 ml	0,4 ml
<i>A. bidest</i>	4,79 ml	3,29 ml	2,29 ml	1,79 ml
SDS-Stammlösung	100 µl			30 µl
APS-Stammlösung	100 µl			30 µl
TEMED	10 µl			5 µl
Endvolumen	10 ml			3 ml

#### 2.2.3.6 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Im Anschluss an eine SDS-PAGE (s. 2.2.3.5) wurden die Gele über Nacht mit einer Coomassie-Färbelösung (0,2 % (w/v) *Coomassie*<sup>®</sup> *Brilliant Blue R250* (Serva, Heidelberg, GER); 40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) gefärbt. Zur Entfärbung kam eine Lösung mit 40 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure zum Einsatz. Mithilfe eines Vakuum-Gelrockners (*Unigeldryer* 3545, Montréal Biotech Inc) wurden die Gele bei 80 °C für 1,5 h unter langsamen Wärmeanstieg getrocknet.

#### 2.2.3.7 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Proteine in einem SDS-Gel alternativ auch unter Verwendung des Kits *Bio-Rad Silver Stain* (Bio-Rad, München, GER) gefärbt. Die

Silberfärbung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Das Trocknen der Gele erfolgte analog zu 2.2.3.6.

#### **2.2.3.8 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot) und Immunodetektion**

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen (Hybond<sup>TM</sup>-C, GE Healthcare, Freiburg, GER) erfolgte in dieser Arbeit elektrophoretisch über das *Semi-dry-Blot*-System. Für das Verfahren des *Semi-dry-Blottings* wurden die *Blot*-Apparaturen Trans-Blot<sup>®</sup> SD Cell (Bio-Rad) sowie Fastblot B43 (Biometra) verwendet, bei der die Komponenten, wie Filterpapier, SDS-Polyacrylamidgel und Nitrozellulosemembran, direkt auf die Metall-Elektroden platziert wurden und eine Kühlung nicht erforderlich war. Der Proteintransfer erfolgte unter Verwendung des Transferpuffers (20 % (v/v) Methanol; 39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,001 % (w/v) SDS) für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA cm<sup>-2</sup> der Oberfläche des SDS-Polyacrylamidgels.

Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau-Lösung (5 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Ponceau S (Sigma-Aldrich, München, GER)) gefärbt. Die Färbelösung wurde anschließend mit TBST-Puffer (12,4 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween-20) von der Membran entfernt und unbesetzte Proteinbindungsstellen mittels 5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer während einer Inkubation auf einem Schüttler bei 4 °C über Nacht blockiert. Anschließend erfolgte die zweistündige Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem gewünschten primären Antikörper (erforderliche Verdünnung in TBS-Puffer (12,4 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl) mit 1 % (w/v) Milchpulver). Nähere Angaben zu den Antiseren und deren Verdünnung sind in der Tabelle 1 zu finden.

Nach insgesamt drei Waschschritten mit TBST- und TBS-Puffer für je 10 min, zum Entfernen von Resten unspezifisch gebundener Antikörper, wurde die Membran für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert war und spezifisch den ersten Antikörper bindet. Abermals wurde die Nitrozellulosemembran dreimal mit TBST- und TBS-Puffer je 10 min gewaschen.

Die Detektion der durch den Antikörper gebundenen Proteine erfolgte unter Verwendung des *ECL<sup>TM</sup> Western Blot Detection Reagent* (GE Healthcare, Freiburg, GER) nach Herstellerangaben und mithilfe einer CCD-Kamera (STELLA 3200, raytest).

#### 2.2.3.9 Tryptischer In-Gel-Proteinverdau für massenspektrometrische Analysen

Der tryptische In-Gel-Verdau ist ein wesentlicher Bestandteil zur massenspektrometrischen Analyse von Proteinen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben einer Co-Immunopräzipitation von FLAG-Ycf54, die in der Arbeitsgruppe Wilde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt wurde, diesem Prozedere unterzogen. Das Risiko der Kontamination mit Keratin wurde bei sämtlichen Arbeitsschritten möglichst minimiert. Verwendete Lösungen wurden frisch und nur mit zweifach destilliertem und gefiltertem Reinstwasser angesetzt. Im Vorfeld wurde das mit SDS-Probenpuffer versetzte Eluat einer SDS-PAGE unterzogen, die nach dem Einlaufen der Gelfront, bis etwa 3 mm in das Trenngel, gestoppt wurde. Nach erfolgter Coomassiefärbung wurde das Gelstück mit den zu analysierenden Proteinen mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die folgenden Schritte der Entfärbung, Reduktion und Alkylierung von SH-Gruppen der in den Proteinen enthaltenen Cysteine sowie der tryptische Verdau und die finale Peptidextraktion wurden nach dem modifizierten Protokoll von Rosenfeld *et al.* (1992) durchgeführt. Zunächst wurde das Gelstück durch Zugabe von 100 µl *A. bidest* für 10 min unter Schütteln gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Waschschritt wiederholt. Die Entfärbung des Coomassie-fixierten Gelstückes erfolgte mit 100 µl Entfärbelösung (30 % (v/v) Acetonitril in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,5) für 15 min bei RT unter Schütteln. Anschließend wurde der Überstand verworfen und der Entfärbeschritt viermal wiederholt. Reste von  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  wurden durch zweimaliges Waschen mit *A. bidest* entfernt. Zuletzt wurde für 15 min mit 100 µl 100 % (v/v) Acetonitril gewaschen und das Gelstück unter Vakuum (CT 02-50R, CHRIST) über Nacht getrocknet. Durch Zugabe von 40 µl Reduzierungslösung (10 mM DTT in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,5) erfolgte die darauffolgende Reduzierung der Cysteine nach 5-minütigem Schütteln bei RT durch eine Inkubation bei 50 °C für 30 min. Nach Verwerfen des Überstandes und Zugabe von 100 µl 100 % (v/v) Acetonitril erfolgte eine Inkubation für 15 min bei RT unter Schütteln. Das Acetonitril wurde anschließend durch 40 µl Alkylierungslösung (54 mM Iodacetamid in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) ersetzt und das Gelstück nun im Dunkeln für 15 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Alkylierungslösung wurde

entfernt und das Gelstück für 10 min bei RT in 100 µl Entfärbelösung geschwenkt. Für den anschließenden Verdau wurde das Gelstück vorsichtig mit einer Kanüle zerkleinert und durch Zugabe von 50 µl Entfärbelösung für weitere 10 min entfärbt. Erneut schloss sich ein Trocknen der Gelstücke unter Vakuum an, bevor der proteolytische Verdau mit Trypsin (Sigma-Aldrich, München GER) erfolgte. Über Nacht wurden die Gelstücke bei RT mit 30 bis 100 µl Trypsinlösung (3 ng µl<sup>-1</sup> Trypsin; 5 % (v/v) Acetonitril; 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH8,5) inkubiert, sodass die Gelstücke vollständig bedeckt waren. Die Peptidextraktion erfolgte durch Zugabe gleichen Volumens an Extraktionslösung (50 % (v/v) Acetonitril; 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure) unter Schwenken für 40 min bei RT. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion der Gelstücke wiederholt. Nach Vereinen der Überstände wurden die extrahierten Peptide zunächst unter Vakuum vollständig eingengt und daraufhin in 20 µl 2 % (v/v) Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Formamid einer 5-minütigen Ultraschallbehandlung unterzogen. Nach abschließender Zentrifugation (13.000 rpm, 3 min, RT) wurde der Überstand bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.10 Massenspektrometrische Analyse mittels LC-MS/MS

Die extrahierten Peptide nach Co-Immunopräzipitation von FLAG-Ycf54 (2.2.3.9) wurden in der Abteilung Pflanzenbiochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Dr. Anja Rödiger massenspektrometrisch durch das LC-System mittels *LTQ ion trap* (Thermo Fisher) analysiert. Die Datenbanksuche wurde mithilfe der Software *TurboSequest* and *PeptideProphet* (Keller *et al.*, 2002) mit dem SEQUEST- (Eng *et al.*, 1994) bzw. Mascot-Algorithmus (Matrix Science) durchgeführt. Die Daten wurden bei der Peptid-Zuordnung mit einer Falschpositivrate (FDR) von 5 % gefiltert.

Alle 6xHis-Pulldown-Eluat wurden analog zu der Probe aus der Co-Immunopräzipitation mit FLAG-Ycf54 mittels SDS-PAGE im Trenngel gesammelt, mit Coomassie fixiert und aus dem Gel ausgeschnitten (s. Abschnitt 2.2.3.9). Die jeweiligen Gelstücke wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sascha Rexroth (Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen; Ruhr-Universität Bochum) am Medizinischen Proteomcenter durch Nicole Plohnke einem In-Gel-Verdau unterzogen und die gewonnenen Peptide massenspektrometrisch per vorgeschalteter nanoHPLC (*NanoAcquity UPLC System*, Waters) „in-line“ mit dem *LTQ-Orbitrap Elite* (Thermo Scientific) analysiert. Dazu wurden die Peptidgemische mit einer C18-Säule (75 µm x 150 mm, 1,8 µm, Säulenmaterial: HSS T3, Waters) getrennt und mit einem kontinuierlich ansteigenden Gradienten von Lösung B (0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril) in Lösung

A (0,1 % (v/v) Ameisensäure in *A. bidest*) eluiert. Die anschließende Datenbanksuche wurde mithilfe der Software *Proteome Discoverer 1.3* (Thermo Scientific) mit dem SEQUEST-Algorithmus durchgeführt. Die Peptid-Zuordnung der finalen Daten erfolgte mit einer Falschpositivrate (FDR) von 5 %.

## 2.2.4 Methoden zur Überexpression rekombinanter Proteine

### 2.2.4.1 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Die heterologe Expression von rekombinanten Proteinen erfolgte in dieser Arbeit in den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3) und Rosetta<sup>TM</sup> (DE3) mit den in der Tabelle 2 dafür bezeichneten Vektoren. Zur Gewährleistung der Selektion wurden Antibiotika gemäß des Stamm-Genotyps und des Vektor-Markers eingesetzt. Die Bakterien wurden durch Inokulation einer Hauptkultur mit 1/100 Volumen einer Vorkultur bei 37 °C auf einem Schüttler bei 225 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6 bis 0,8 angezogen. Anschließend wurde die Proteinsynthese mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für weitere 4 h bei 37 °C unter ständigem Schütteln. Zuletzt wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet und das Bakterienpellet bei -20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Zur Überprüfung des Expressionserfolges wurden vor der Induktion sowie im Abstand von 60 min nach erfolgter Induktion je 2 ml der Kultur entnommen und zentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C). Die Bakterienpellets wurden im Folgenden in 100 µl 1x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10 % (v/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS; 100 mM DTT; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) resuspendiert. Nach 10-minütiger Denaturierung unter regelmäßigem Mischen bei 95 °C wurden die Proben mittels SDS-PAGE analysiert, bevor die Aufreinigung des rekombinanten Proteins durchgeführt wurde.

Der Nachweis zur Löslichkeit des rekombinanten Zielproteins erfolgte anhand einer für 4 h IPTG-induzierten 100 ml Bakterienkultur, deren Zellpellet nach Zentrifugation (5000 rpm, 10 min, 4 °C) in 5 ml Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol, pH 8,0) resuspendiert wurde. Nach Zugabe von 1 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym (Serva, Heidelberg, GER) erfolgte die Lyse für 30 min auf Eis. Das Lysat wurde zusätzlich einer 2-minütigen Ultraschallbehandlung unterzogen, bevor sich eine Zentrifugation bei 10.000 × g für 20 min und 4 °C anschloss. Der Überstand mit den enthaltenen löslichen Proteinen wurde überführt

und das Pellet erneut mit 5 ml Lysispuffer versetzt. Eine Hälfte des zweiten Lysats wurde mit 0,25 % (v/v) Tween 20 und 0,1 mM EGTA gemischt und erneut zentrifugiert, um membranassoziierte Proteine im Überstand zu erhalten. Die andere Hälfte des zweiten Lysats wurde nicht weiter verarbeitet, es enthielt die unlöslichen Zellbestandteile. Jeweils eine Probe, vermengt mit 2x SDS-Probenpuffer (0,09 M Tris/HCl, pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS; 0,1 M DTT; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) wurde für 10 min bei 95 °C erhitzt, anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min) und mittels SDS-PAGE analysiert.

#### **2.2.4.2 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli***

Für die native Aufreinigung von löslichen, rekombinanten Proteinen aus *E. coli* Rohextrakt wurde das aus Abschnitt 2.2.4.1 gewonnene Bakterienpellet nach Protokollempfehlungen von *The QIAexpressionist*<sup>TM</sup> (Qiagen, Hilden, GER) in 5 ml Lysis-Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol, pH 8,0) resuspendiert und mit 1 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym (Serva, Heidelberg, GER) versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat für 2 min mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert (10.000 × g, 20 min, 4 °C). Der Überstand mit den gewünschten löslichen Proteinen wurde zuletzt durch einen Spritzenfilter mit 0,45 µm Porengröße (Carl Roth, Karlsruhe, GER) filtriert.

Die in dieser Arbeit generierten rekombinanten Proteine waren alle mit einer N-terminalen Fusion des Hexa-Histidin(6xHis)-tags versehen, sodass eine affinitätschromatographische Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden, GER) ermöglicht und nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Der Erfolg und die Qualität der Aufreinigung wurden mittels SDS-PAGE überprüft.

Für weitere Untersuchungen wurde der Puffer des Eluats mithilfe der *Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheit* (Millipore, Darmstadt, GER) durch PBS (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl, pH 7,4) mit *cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (1 Tablette in 10 ml PBS; Roche Applied Science, Mannheim, GER) ersetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben und wurde zusätzlich mittels SDS-PAGE und BSA-Standards überprüft. Zur Lagerung der aufgereinigten Proteine wurde die Probe mit 50 % (v/v) Glycerol versetzt und bei -80 °C eingefroren.



### 2.2.4.3 *In-vitro*-Bindungsassay (6xHis-Pulldown)

Der 6xHis-Pulldown wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* nachzuweisen. Die Methode basiert darauf, dass ein in *E. coli* rekombinant exprimiertes 6xHis-Fusionsprotein als „Köder“ (*bait*) an Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden, GER) immobilisiert und mit „Beute“-Proteinen (*prey*) inkubiert wird, um potenzielle Interaktionspartner nach Wasch- und Elutionsschritten zu identifizieren.

Für diese Interaktionsstudie wurden die in dieser Arbeit heterolog exprimierten 6xHis-Fusionsproteine (Abschnitt 2.2.4.1) zunächst wie im Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben aufgereinigt, um folglich von diesen eine definierte Proteinmenge erneut an die Ni-NTA-Agarose zu koppeln. Bei einer Bindungskapazität der Ni-NTA-Agarose von 5 bis 10  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  wurden entsprechend 750  $\mu\text{g}$  des aufgereinigten Proteins in 4 ml mit Protease-Inhibitor-versetztem PBS (s.o.) gemischt und zusammen mit 300  $\mu\text{l}$  Ni-NTA-Agarose-Lösung abgedunkelt für 1 h bei 4 °C unter Schwenken vorinkubiert. Währenddessen wurden etwa 500  $\mu\text{l}$  lysierter Chloroplasten (0,7-1,0  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ; Abschnitt 2.2.5.2) mit *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid ( $\beta$ -DM; 0,4 % (w/v) Endkonzentration) für 10 min auf Eis solubilisiert. Nach anschließender Zentrifugation (13.000 rpm; 30 min, 4 °C) wurde der Lysat-Überstand zu dem vorinkubierten Ansatz hinzugegeben, mit PBS inklusive Protease-Inhibitor auf 10 ml aufgefüllt und für eine weitere Stunde bei 4 °C unter vorsichtigem Schwenken inkubiert. Die hierbei gebundenen, potenziellen Interaktionspartner des 6xHis-Fusionsprotein wurden analog wie im Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben aufgereinigt. Als Negativkontrolle diente zum einen die ungebundene Ni-NTA-Agarose und zum anderen ein 6xHis-Fusionsprotein von AtRIBA1 (AT5G64300) mit einer in Hinblick auf die „codon usage“ von *E. coli* optimierten Sequenz. Die finalen Eluate wurden einer SDS-PAGE unterzogen und zur weiteren Analyse und Identifizierung noch unbekannter Proteinen massenspektrometrisch untersucht (s. Abschnitt 2.2.3.10).

## 2.2.5 Zellbiologische Methoden und Bestimmung von Enzymaktivitäten

### 2.2.5.1 Herstellung von Pflanzenextrakten aus *Arabidopsis* und *Nicotiana tabacum*

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten, wie es in den Abschnitten 2.2.5.4 bis 2.2.5.6 beschrieben ist, musste vorerst der erforderliche Pflanzenextrakt hergestellt werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten hierbei auf Eis oder bei 4 °C. Blattmaterial von etwa 4 Wochen alten

Keimlingen von *Arabidopsis*, die in einer Pflanzschale angezogen wurden oder rund 10 g Blattmaterial von *Nicotiana tabacum* wurden eingesetzt. Vornehmlich erfolgte dabei die Blatternte bei Tabak-Pflanzen nach 20 h Dunkelheit, um störende Stärkeakkumulationen zu minimieren. Das Pflanzenmaterial wurde in einem Mixer in 100 ml Homogenisierungspuffer (0,4 M Sorbitol; 10 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,1 % (w/v) BSA; 20 mM Tricin/KOH, pH 8,0) homogenisiert und anschließend durch eine Lage Miracloth (Merck, Darmstadt, GER) filtriert. Anschließend wurde der Pflanzenextrakt für 8 min bei 500 × g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurden nach Dekantieren des Überstandes vorsichtig in 1 ml Homogenisierungspuffer ohne BSA resuspendiert und bis zur direkten, weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.2.5.2 Isolierung intakter Chloroplasten aus *Arabidopsis*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pulldown-Experimente von aufgereinigten His-getaggten Proteinen mit lysierten Chloroplasten aus *Arabidopsis* durchgeführt, die vorab eine Isolierung intakter Chloroplasten erforderten. Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte nach der Methode von Kunst (1998) und die dafür nötigen Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis. Zunächst wurden Keimlinge von *Arabidopsis* in einer Pflanzschale für 4 Wochen im Kurztag (s. Abschnitt 2.2.1.3) angezogen. Das vollständige Blattmaterial wurde im Mixer in 250 ml Homogenisierungspuffer (450 mM Sorbitol; 10 mM EDTA; 10 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,1 % (w/v) BSA; 20 mM Tricin/KOH, pH 8,4) homogenisiert und durch zwei Lagen Miracloth (Merck, Darmstadt, GER) gefiltert. Nach anschließender Zentrifugation (500 × g, 8 min, 4 °C) wurden die pelletierten Chloroplasten in 1 bis 2 ml Resuspensionspuffer (300 mM Sorbitol; 12,5 mM EDTA; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM Tricin/KOH, pH 8,4) gelöst und auf einen diskontinuierlichen Percollgradienten (40 % und 80 % (v/v) Percoll<sup>TM</sup> (GE Healthcare, Freiburg, GER) in Resuspensionspuffer) geschichtet. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 6500 × g, 4 °C im Ausschwingrotor bei langsamer Beschleunigung und ohne Bremse wurden die intakten Chloroplasten an der Dichtegrenze mittig des Gradienten gesammelt. Vorsichtig wurden die Chloroplasten auf 20 ml Resuspensionspuffer gegeben und leicht gemischt, um Percollreste zu entfernen. Zuletzt wurden die Chloroplasten durch Zentrifugation bei 3800 × g für 6 min bei 4 °C wieder im Ausschwingrotor bei langsamer Beschleunigung und ohne Bremse pelletiert. Die Resuspension der Chloroplasten erfolgte in etwa 1 ml mit *cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (1 Tablette in 10 ml PBS; Roche Applied Science, Mannheim, GER) versetztem PBS (20 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 150 mM NaCl, pH 7,4). Die so lysierten Chloroplasten konnten direkt für nachfolgende Versuche verwendet werden oder bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert werden.

### 2.2.5.3 Bestimmung der ALA-Synthesekapazität

Die Bestimmung der ALA-Synthesekapazität beruht auf der Hemmung der ALA-Dehydratase durch den kompetitiven Inhibitor Lävulinsäure, infolgedessen das Substrat ALA akkumuliert. Hierbei erfolgt die Detektion der gebildeten ALA durch eine Kondensationsreaktion mit Ethylacetoacetat und der darauf folgenden Farbreaktion des entstandenen Pyrrols (Mauzerall & Granick, 1956). Resultierend aus der Quantifizierung der akkumulierten Menge an ALA können Rückschlüsse auf die Aktivität der ALA-synthetisierenden Enzyme gezogen werden.

Für die Bestimmung der ALA-Synthesekapazität in *Synechocystis*-Zellen wurden etwa 150 ml einer Flüssigkultur in TES-gepuffertem BG11-Medium mit Lävulinsäure (Endkonzentration 40 mM; pH-Wert der Stammlösung auf 7,2 mit 200 mM Tris/HCl eingestellt) versetzt und für 4 h bei schwachen Lichtverhältnissen (s. 2.2.1.2) inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (4.800 rpm, 4 °C, 10 min) wurden die Zellen sedimentiert und zur Extraktion von gebildetem ALA in 1 ml 20 mM K-Phosphatpuffer (pH 6,8) resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen erfolgte der Aufschluss in der Zelmühle (40 s<sup>-1</sup>, 10 min, 4 °C). Unaufgeschlossene Zellen und die Glasperlen wurden durch Zentrifugation (4 °C, 3.000 rpm, 5 min) entfernt und der resultierende Gesamtextraktes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt.

Für die Bestimmung der ALA-Synthesekapazität in Pflanzenzellen wurden rund 50 bis 100 mg Blattmaterial in 5 ml Inkubationspuffer (40 mM Lävulinsäure; 20 mM Tris/HCl, pH 7,2) für 4 h unter den gegebenen Anzuchtbedingungen inkubiert. Anschließend wurde mithilfe von Zellstofftüchern das Blattmaterial von Flüssigkeitsresten befreit und in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das Pflanzenhomogenisat wurde in 1 ml 20 mM K-Phosphatpuffer (pH 6,8) resuspendiert und zur Abtrennung von Pflanzenresten zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min, 4 °C). Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis aufbewahrt.

Zur Bestimmung der ALA-Synthesekapazität wurden schließlich 400 µl des gewonnenen Extraktes mit 100 µl Ethylacetoacetat vermengt, für 10 min bei 95°C erhitzt und anschließend

auf Eis abgekühlt. Zuletzt wurden 500 µl des frisch angesetzten modifizierten Ehrlich's-Reagenz (75 % (v/v) Essigsäure; 12,5 % (v/v) Perchlorsäure; 3,1 g l<sup>-1</sup> Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 18,2 g l<sup>-1</sup> *p*-Dimethylaminobenzaldehyd) hinzu gegeben, für 5 min zentrifugiert (13.000 rpm, RT) und die ALA-Derivate im Überstand spektrophotometrisch bei den Wellenlängen 553 und 600 nm gemessen. Eine Kalibrierung mit 1 mM ALA-Standardlösung diente der Berechnung akkumulierten ALA-Gehaltes in den Proben.

#### 2.2.5.4 Bestimmung der Mg-Chelatase-Aktivität

Zur Bestimmung der Mg-Chelatase-Aktivität in *Synechocystis* nach einem modifizierten Protokoll von Wilde *et al.* (2004) wurden Zellen einer 500-ml-Flüssigkultur geerntet (4.800 rpm, 10 min, 4 °C) und in Isolationspuffer (0,5 M Sorbitol; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 50 mM Tricin/KOH, pH 7,8) in der Zelmühle aufgeschlossen (Abschnitt 2.2.1.8). Unaufgeschlossene Zellen und die Glasperlen wurden daraufhin bei 3.000 rpm und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Bevor die Enzymreaktion gestartet wurde, erfolgte die Einstellung der Proteinkonzentration des Gesamtextraktes auf 2 mg ml<sup>-1</sup>. Schließlich wurden 50 µl des auf 30 °C vorgewärmten Homogenisates mit 50 µl 2x Assay-Mix (10 mM ATP; 3 µM ProtoIX; 10 mM Tricin/KOH, pH 7,8) gemischt und die abgedunkelte Reaktion nach 0, 15 und 30 min gestoppt, indem 400 µl eisgekühltes Aceton:Methanol:0,1 N NH<sub>4</sub>OH (10:9:1, v/v/v) hinzu gegeben wurde. Die während der Inkubationszeit gebildeten Mg-Porphyrine wurden mittels HPLC wie im Abschnitt 2.2.1.12 beschrieben quantifiziert.

Die Bestimmung der Mg-Chelatase-Aktivität in *Arabidopsis* oder *Nicotiana tabacum* erfolgte analog zu der beschriebenen für *Synechocystis*, mit dem Unterschied, dass vorher Pflanzenextrakte hergestellt (s. Abschnitt 2.2.5.1) und die Reaktionen nach 0, 5, 10, 15 und 30 min gestoppt wurden.

#### 2.2.5.5 Bestimmung der Fe-Chelatase-Aktivität

Der Fe-Chelatase-Assay basiert auf der Fähigkeit der Fe-Chelatase neben Fe<sup>2+</sup> auch andere divalente Kationen, wie z.B. Zn<sup>2+</sup>, als Substrat nutzen zu können. Im Unterschied zu Fe-ProtoIX fluoresziert das Zn-ProtoIX und kann folglich problemlos detektiert werden. Um die Aktivität der Fe-Chelatase in *Synechocystis*-Zellen bestimmen zu können, wurden in Anlehnung an Sobotka *et al.* (2008) zunächst etwa 50 ml einer Flüssigkultur pelletiert und in 1 ml Isolationspuffer (0,5 M Mannitol; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 20 mM

Hepes/NaOH, pH 7,6) resuspendiert. Im Anschluss an den Zellaufschluss (Abschnitt 2.2.1.8) wurde der Überstand mit *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (0,5 % (w/v) Endkonzentration) auf Eis für 10 min solubilisiert. Eine darauf folgende 30-minütige Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C) trennte das nicht solubilisierte Material ab. Nach erfolgter Proteinbestimmung (Abschnitt 2.2.3.4) wurden 20  $\mu$ g Protein des Gesamtextraktes zum Reaktionsmix (2  $\mu$ M ProtoIX; 2  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>; 0,03 % (v/v) Tween 80; 0,3 M Tris/HCl, pH 8,0) gegeben, sodass ein Endvolumen von 1,5 ml erreicht wurde. Die Proben wurden abgedunkelt bei 34 °C inkubiert und die Reaktion nach 0 und 60 min durch Zugabe von Aceton:0,1 N NH<sub>4</sub>OH (9:1, v/v) gestoppt. Der Gehalt an extrahiertem Zn-ProtoIX wurde mittels HPLC wie im Abschnitt 2.2.1.12 beschrieben quantifiziert.

#### **2.2.5.6 Bestimmung der Methyltransferase-Aktivität**

Der Bestimmung der Methyltransferase-Aktivität in SNN- und *LCAA*-Antisense-Tabakpflanzen ging die Herstellung von Pflanzenextrakten voraus (s. Abschnitt 2.2.5.1). Die Reaktionen wurden durch das Mischen von 50  $\mu$ l Extrakt mit 50  $\mu$ l vorgewärmten 2x Assay-Puffer (0,8 M Sorbitol; 20 mM NaHCO<sub>3</sub>; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1 mM SAM; 40  $\mu$ M Mg-Proto; 40 mM Tricin/KOH, pH 8,0) gestartet und abgedunkelt bei 30 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach 0, 2, 5 und 7 min durch Zugabe von 400  $\mu$ l eisgekühlten Aceton:Methanol:0,1 N NH<sub>4</sub>OH (10:9:1, v/v/v). Die extrahierten Mg-Porphyrine wurden mittels HPLC wie im Abschnitt 2.2.1.12 beschrieben quantifiziert und auf den Proteingehalt der eingesetzten Extrakte bezogen.

#### **2.2.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie**

Für die Dokumentation zur Lokalisation von AtLCAA-GFP-Fusionsproteinen wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop *CLSM TCS SP2 AOB*s der Firma Leica (Wetzlar, GER) verwendet. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit einem 100 mW Argon-Laser und der Software vom Hersteller. Das Fluorophor GFP wurde bei einer definierten Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 500-560 nm detektiert. Die Chlorophyllautofluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 620-700 nm detektiert.

#### **2.2.7 Statistische Methoden**

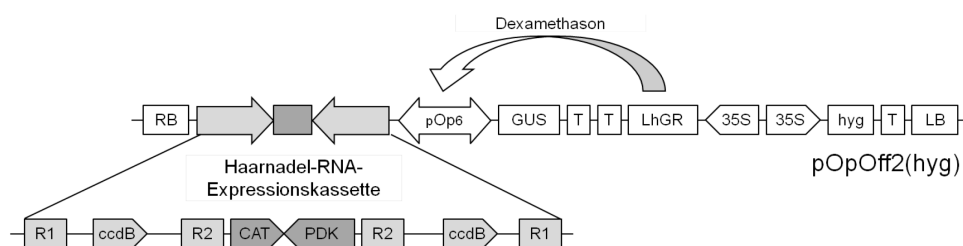
Die statistische Auswertung sämtlicher Ergebnisse dieser Arbeit erfolgte durch Ermittlung des Mittelwertes und der Standardabweichung, als Maß für die Streuung der Stichproben um den

Mittelwert. Signifikanzen von Unterschieden zwischen zwei Stichproben wurden nach Varianzvergleich (F-Test) mithilfe des zweiseitigen Student's t-Test berechnet. Die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (*One Way Analysis of variance*) mit paarweisen Einzelvergleichen (Holm-Sidak-Methode) wurde unter Zuhilfenahme der Software *SigmaPlot*<sup>®</sup> 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) durchgeführt. Ein Unterschied gilt als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ( $p < 0,05$ ) ist und als sehr signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 % ( $p < 0,001$ ) ist. Der Auswertung lagen mindestens zwei unabhängige Versuche mit jeweils drei oder mehr biologischen Replikaten zugrunde ( $n \geq 3$ ). Im Fall von Darstellungen von Transkript- oder Proteinquantifizierungen wurden repräsentative Abbildungen eines Experiments ausgewählt, die sich in den Wiederholungen bestätigen ließen.

### 3 Ergebnisse

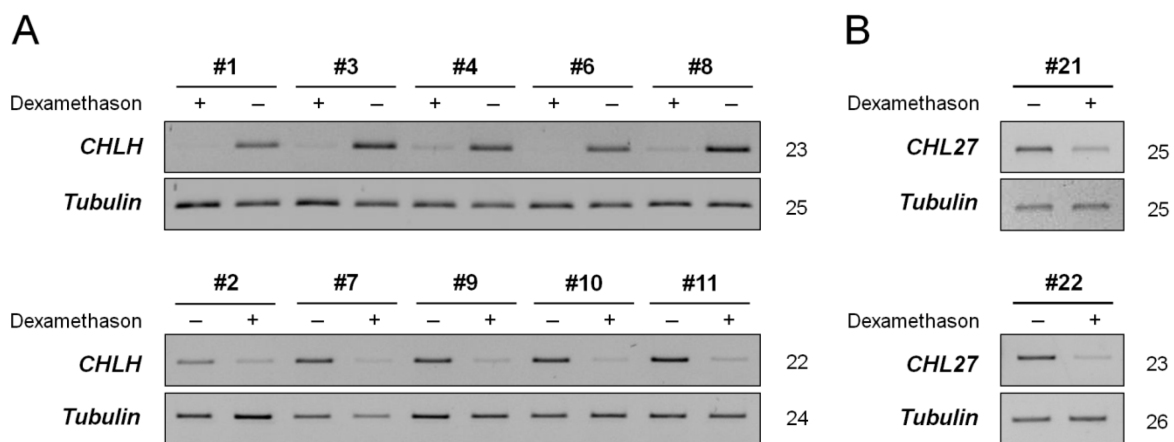
#### 3.1 Untersuchungen zur induzierten Deaktivierung von zwei tetrapyrrolbiosyntheserelevanten Genen

Unter dem Gesichtspunkt der kontrovers diskutierten tetrapyrrolvermittelten retrograden Signale, war es das Anliegen, in dieser Arbeit zu prüfen, ob unmittelbar nach Inaktivierung eines Enzymschritts des Mg-Zweiges der Tetrapyrrolbiosynthese, die Kerngenexpression verändert wird. Hierbei lag das Augenmerk auf der frühzeitig modifizierten Veränderung der Genexpression infolge verringerter oder erhöhter Enzymaktivität in der Tetrapyrrolbiosynthese unter Ausschluss pleiotroper Effekte anderer Signale. Die Intaktheit und allgemeine Funktionalität der Chloroplasten sollte gewährleistet bleiben. Konstitutive Mutanten, die aufgrund einer Mutation bereits in der frühen Embryogenese Beeinträchtigungen aufweisen, kamen demzufolge nicht in Frage. Ebenso schlossen sich Experimente mit Herbizid-Behandlungen zur Beeinflussung plastidärer Funktionen während der Keimung aus. Aus diesem Grund wurde die induzierbare Gendeaktivierung in adulten grünen Pflanzen mithilfe von RNA-Interferenz (RNAi) genutzt, um die tetrapyrrolvermittelte, chloroplastidäre Signalgebung in Hinblick auf die nukleäre Genexpression zu beurteilen. Zur Anwendung kam der Vektor pOpOff2(hyg), der u. a. ein Gen zur konstitutiven Expression eines chimärischen Transkriptionsfaktors trägt. Dieser aktiviert wiederum nur in Anwesenheit des künstlichen Glucocorticoids Dexamethason die vom pOp6-Promotor ausgehende



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des binären Vektors pOpOff2(hyg) zur Generierung der transgenen *Arabidopsis* RNAi-Linien in Anlehnung an Wielopolska *et al.* (2005). Kurze Abschnitte der kodierenden Regionen von *CHLH* (*AT5G13630*) und *CHL27* (*AT3G56940*) wurden über die GATEWAY™ *attR1*-(R1-) und *attR2*-(R2-)Seiten in die Haarnadel-RNA-Expressionskassette des pOpOff2(hyg)-Vektors mittels Rekombination integriert. Die Transkription zur Bildung der Haarnadel-RNAs, erfolgte durch den pOp6-Promotor nach Aktivierung durch den Dexamethason-responsiven, chimärischen Transkriptionsfaktor LhGR. RB, rechte Bordersequenz; GUS, kodierende Sequenz für die bakterielle  $\beta$ -Glucuronidase; T, Terminator; 35S, *Cauliflower mosaic virus* 35S-Promotor; hyg, Hygromycin-Resistenzkassette LB, linke Bordersequenz; *ccdB*, Suizidgen, das für einen Inhibitor der bakteriellen DNA-Gyrase kodiert; CAT und PDK, Intronsequenzen zur Stabilisierung der Haarnadel-RNA

Transkription zur Bildung der RNAi-induzierenden kurzen Haarnadel-RNA (Abbildung 5). Mit den Primern att-CHLH-RNAi\_fw und att-CHLH-RNAi\_rev sowie att-CHL27-RNAi\_fw und att-CHL27-RNAi\_rev wurden 280 bp bzw. 296 bp lange Fragmente der kodierenden Regionen von *CHLH* (AT5G13630) und *CHL27* (AT3G56940) amplifiziert. Die Amplifikate wurden über Rekombination mithilfe der GATEWAY®-Technologie final in den Vektor pOpOff2(hyg) inseriert. Es konnten insgesamt zehn Primärtransformanten der *CHLH*-RNAi-Linie und zwei der *CHL27*-RNAi-Linie generiert werden, die ausnahmslos eine induzierte Gendeaktivierung von *CHLH* (Abbildung 6A) bzw. *CHL27* (Abbildung 6B) in den mit Dexamethason-behandelten Blättern gegenüber den unbehandelten Blättern zeigten.

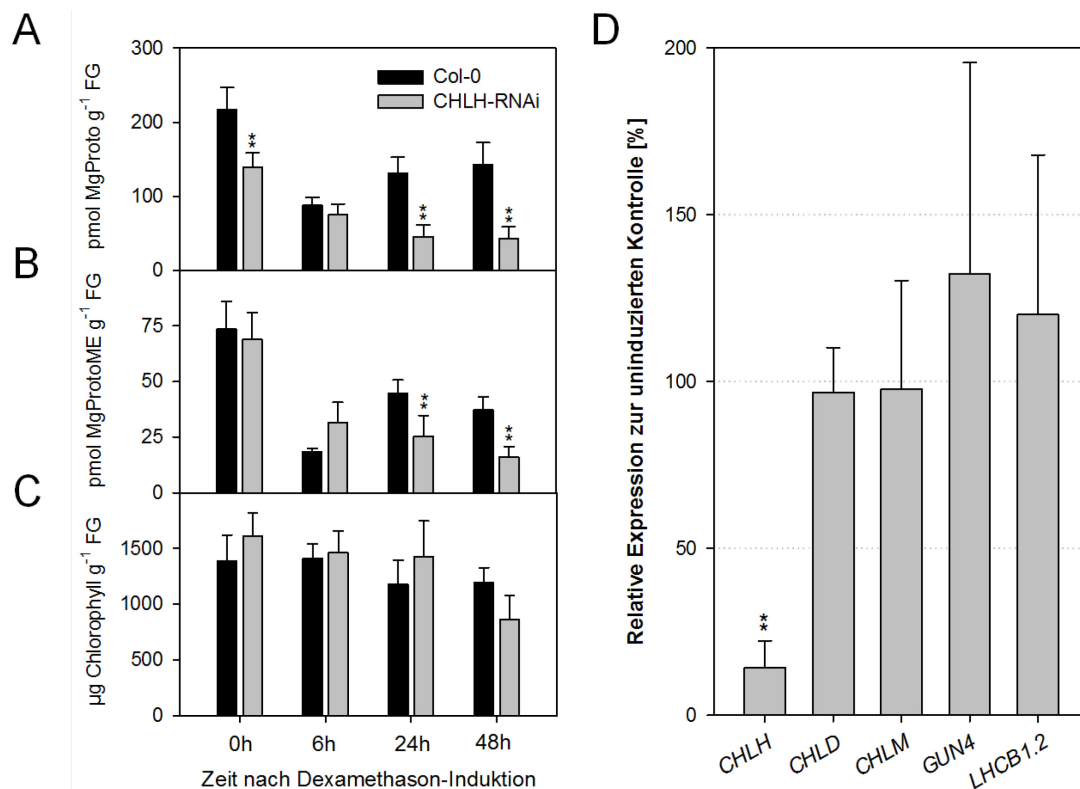


**Abbildung 6:** Nachweis zur induzierten Gendeaktivierung in den *CHLH*- und *CHL27*-RNAi-Linien der T<sub>1</sub>-Generation mittels semiquantitativer PCR. Einzelblätter von (A) zehn *CHLH*-RNAi-Linien und (B) zwei *CHL27*-RNAi-Linien wurden mit 20 µg ml<sup>-1</sup> Dexamethason behandelt und über Nacht inkubiert (+). Als Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Blätter derselben Pflanze (-). Die Transkriptgehalte von *CHLH* bzw. *CHL27* waren in den entsprechenden RNAi-Linien im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringert. Das Transkript *Tubulin* (*TUA5*) wurde als interne Kontrolle für die Verwendung gleicher cDNA-Mengen in den semiquantitativen PCRs genutzt. Hinter den dargestellten PCR-Produkten ist die PCR-Zyklusanzahl gezeigt.

Um den Fortbestand der einzigen beiden *CHL27*-RNAi-Primärtransformanten zu gewähren, wurden zunächst erste physiologische und genetische Analysen mit den *CHLH*-RNAi-Linien #3, #7 und #8 durchgeführt. Vergleichend wurden die Mg-Porphyrin- und Chlorophyllgehalte in Einzelblättern der transgenen Linien und des Wildtyps vor sowie 6 h, 24 h und 48 h nach der Dexamethason-Behandlung analysiert. Das Produkt der Mg-Chelatase, MgProto, war zum Zeitpunkt 24 h und 48 h nach der Gendeaktivierung durch Dexamethason in den *CHLH*-RNAi-Linien signifikant im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abbildung 7A). Ähnlich verhielt es sich mit den Gehalten an MgProtoME, die ebenfalls nach 24- und 48-stündiger Dexamethason-Behandlung in den transgenen Linien in geringeren Mengen akkumulierten als im Wildtyp (Abbildung 7B). Während sich die Chlorophyllgehalte bis 24 h nach



Dexamethason-Induktion in den *CHLH*-RNAi-Linien noch unverändert zeigten, zeichnete sich nach weiteren 24 h eine allmähliche Verringerung gegenüber dem Wildtyp ab (Abbildung 7C). Ab diesen späteren Zeitpunkten ist demnach die Intaktheit und Funktionalität der Chloroplasten gefährdet. Erste Transkriptanalysen in 24 h mit Dexamethason-behandelten Blättern der *CHLH*-RNAi-Linien bestätigten eine um etwa 85% verringerte *CHLH*-Genexpression relativ zu den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 7D). Alle weiteren, getesteten, kernkodierten Gene, die für die CHLD-Untereinheit der Mg-Chelatase, die Methyltransferase, GUN4 und das chlorophyllbindende Protein des Lichtsammelkomplexes des Photosystems II (LHCB1.2) kodieren, waren jedoch in ihrer Expression nicht signifikant verändert.



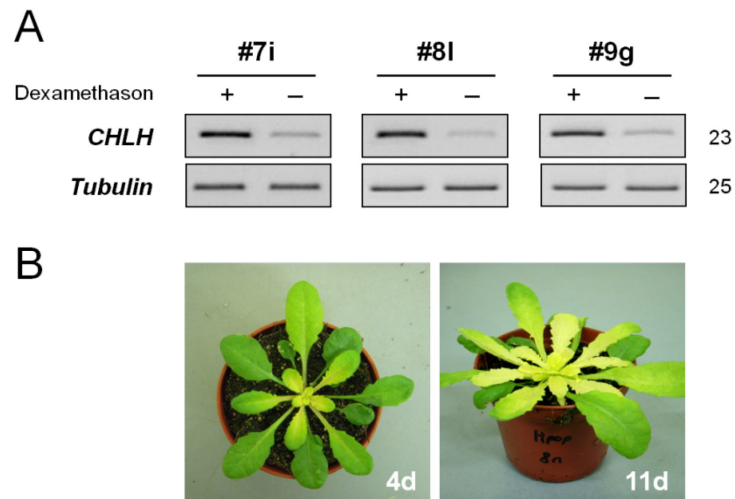
**Abbildung 7:** Physiologische und genetische Analyse von *CHLH*-RNAi-Linien. In Einzelblättern von Wildtyp Col-0 und der *CHLH*-RNAi-Linien #3, #7 und #8 der T<sub>1</sub>-Generation, die im Kurztag für 0 h, 6 h, 24 h und 48 h mit 20 µg ml<sup>-1</sup> Dexamethason behandelt wurden, erfolgte die Ermittlung der *steady-state*-Gehalte von (A) MgProto, (B) MgProtoME und (C) des Gesamtchlorophyllgehaltes, bezogen auf das Frischgewicht (FG). (D) Die Transkriptanalyse mittels qPCR erfolgte in einzelnen Blättern der *CHLH*-RNAi-Linien #3, #7 und #8 24 h nach der Gen-Stilllegung in Relation zu unbehandelten Blättern als Kontrolle. Von den untersuchten Transkriptabundanz nukleärer Gene, die für die Mg-Chelatase-Untereinheiten CHLH und CHLD, die Methyltransferase, GUN4 und das chlorophyllbindende Protein LHCB1.2 kodieren, zeigte nur *CHLH* eine signifikante Veränderung (Reduktion auf unter 20 % des Gehaltes der Kontrolle). Als Referenzgen diente *Actin2*. Werte der *CHLH*-RNAi-Linien wurden in allen Analysen gemittelt. (\*\*) Sehr signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,01$

Insgesamt konnten acht der zehn *CHLH*-RNAi-Linien und die zwei *CHL27*-RNAi-Linien erfolgreich zur Samenbildung gebracht werden. Das gewonnene Saatgut wurde im Folgenden einem Screening unterzogen, bei dem das Verhältnis von gekeimten zu Hygromycin-resistenten Keimlingen ermittelt wurde. Hierbei wiesen die *CHLH*-RNAi-Linie #8 und die *CHL27*-RNAi-Linie #21 die höchsten Keimungsraten unter Hygromycin-Selektion auf (Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Screening der *CHLH*- und *CHL27*-RNAi-Linien der T<sub>1</sub>-Generation. Anhand des Verhältnisses von gekeimten Samen zu resistenten Keimlingen, die das 14-tägige Wachstum auf MS-Medium mit 35 µg ml<sup>-1</sup> Hygromycin überlebten, wurde die Keimungsrate bestimmt. Die höchsten Keimungsraten sind fett markiert.

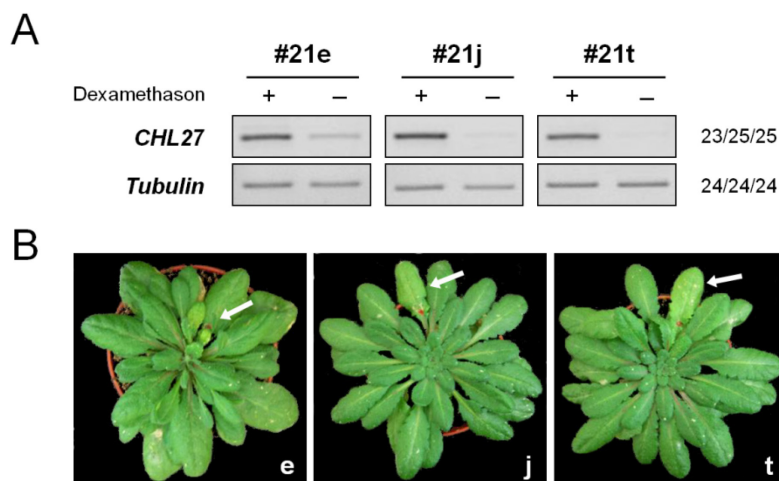
Linie (T <sub>1</sub> -Generation)	Anzahl ausgesäter Samen	Anzahl gekeimter Samen	Anzahl resistenter Keimlinge	Keimungsrate unter Selektion
<i>CHLH</i> -RNAi				
#1	179	156	93	60 %
#2	135	120	59	49 %
#3	137	136	69	51 %
#6	136	128	69	54 %
#7	135	131	76	58 %
#8	149	149	116	<b>78 %</b>
#9	230	114	30	26 %
#10	159	155	13	8 %
<i>CHL27</i> -RNAi				
#21	176	175	127	<b>73 %</b>
#22	281	252	62	25 %

Jeweils vier Nachkommen einer jeden *CHLH*-RNAi-Linie wurden erneut mittels semiquantitativer PCR auf die Induzierbarkeit der *CHLH*-Gendeaktivierung infolge einer 24-stündigen Dexamethason-Behandlung getestet. Die T<sub>2</sub>-Generationen der transgenen Linien #7, #8, #9 und #10 zeigten die einheitlichsten Transkriptvermindierungen für alle vier untersuchten Pflanzen (Daten nicht gezeigt). Die deutlichsten *CHLH*-Gendeaktivierungen wurden für die *CHLH*-RNAi-Pflanzen #7i, #8l und #9g beobachtet (Abbildung 8A), die letztlich für weitere Analysen ausgewählt wurden. Um die Auswirkung einer mehrtägigen Dexamethason-Behandlung auf den Phänotyp zu untersuchen, wurde versuchsweise ein Vertreter der Linie #8 vollständig mit Dexamethason behandelt. Nach vier Tagen war ein erstes Ausbleichen der jüngeren Blätter zu beobachten und nach elf Tagen zeigten sich in den neu entwickelten Blättern deutliche, flächige Chlorosen (Abbildung 8B).



**Abbildung 8:** Repräsentative *CHLH*-RNAi-Linien. (A) Semiquantitative PCRs belegten den deutlichen Effekt der dexamethasoninduzierten Gen-Stillegung nach 24 h in Einzelblättern für die *CHLH*-RNAi-Pflanzen #7i, #8l und #9g der T<sub>2</sub>-Generation. (B) Stellvertretend für die *CHLH*-RNAi-Linie #8 ist die Auswirkung einer mehrtägigen Dexamethason-Behandlung auf den Phänotyp anhand der T<sub>2</sub>-Pflanze #8n gezeigt. Nach vier Tagen (4d) waren erste Chlorosen zu beobachten, infolge der induzierten RNA-Interferenz durch Dexamethason, dessen systemische Ausbreitung in den jungen Blättern nach elf Tagen (11d) deutlich zu beobachten war.

Parallel zu den *CHLH*-RNAi-Linien wurden je 26 T<sub>2</sub>-Pflanzen beider *CHL27*-RNAi-Linien auf die Induzierbarkeit der *CHL27*-Gendeaktivierung nach 24-stündiger Dexamethason-Behandlung getestet. Von drei Pflanzen, die die stärksten mRNA-Reduktionen für *CHL27* 24 h nach Induktion zeigten, wurden zusätzlich Einzelblätter 6 h nach Dexamethason-Behandlung analysiert. Hierbei wies die T<sub>2</sub>-Pflanze #21j die deutlichste und damit schnellste Transkriptverminderung für *CHL27* auf (Abbildung 9A), deren Nachkommen folglich für alle

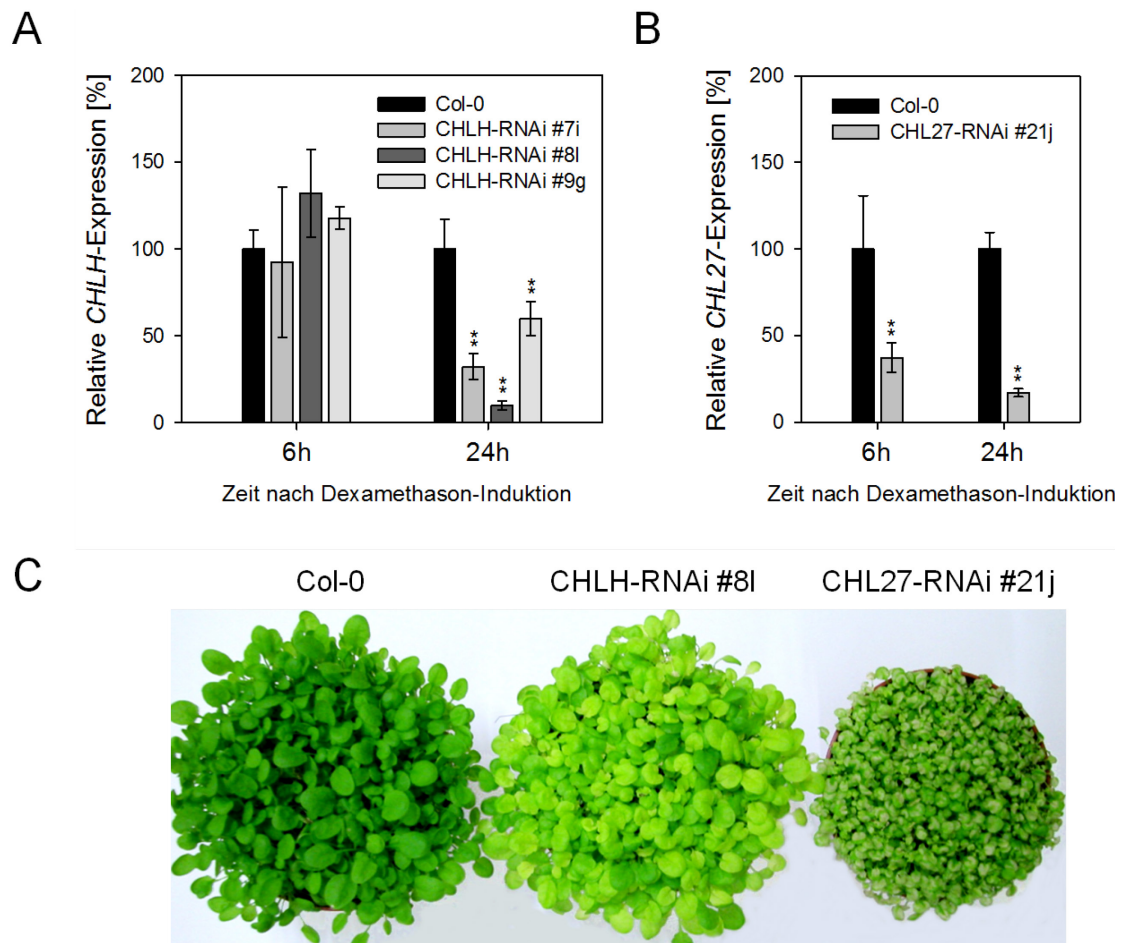


**Abbildung 9:** Repräsentative *CHL27*-RNAi-Linien. (A) Die Analyse der Transkriptgehalte nach 6 h in mit (+) und ohne (-) Dexamethason behandelten Einzelblättern der *CHL27*-RNAi-Linie #21 belegte mittels semiquantitativer PCR die deutlichste Reduktion an *CHL27*-Transkripten für die *CHL27*-RNAi-Pflanze #21j. (B) Einzelblätter (s. Pfeil) der T<sub>2</sub>-Nachkommen e, j, und t der *CHL27*-RNAi-Linie #21 zeigen 10 Tage nach Behandlung mit 20 µg ml<sup>-1</sup> Dexamethason ein schwaches Ausbleichen.

weiteren Experimente herangezogen wurden. Ferner sind in der Abbildung 9B Einzelblätter dieser drei Pflanzen e, j und t der CHL27-RNAi-Linie #21 hervorgehoben, die zumindest ein leichtes Ausbleichen nach zehn Tagen der Dexamethason-Induktion zeigten. Erste Hinweise auf erhöhte *steady-state*-Gehalte an MgProtoME in induzierten Blättern der CHL27-RNAi-Pflanze #21j gegenüber uninduzierten Blättern (Daten nicht gezeigt) konnten in weiteren Analysen der Folgegeneration durch Hagen Schlicke eindeutig bestätigt werden (Schlicke *et al.*, 2014).

Mit dem Ziel, die CHLH- und CHL27-RNAi-Linien der T<sub>3</sub>-Generation einer globalen Transkriptionsanalyse zur Beurteilung der tetrapyrrolvermittelten retrograden Signale zu unterziehen, wurden in dieser Arbeit die erforderlichen Voranalysen durchgeführt. Das experimentelle Design sah zunächst eine knapp dreiwöchige Anzucht der transgenen Linien und des Wildtyps unter Kurztagbedingungen (10 h Licht, 14 h Dunkelheit) bei 110  $\mu\text{mol Photonen m}^{-1} \text{s}^{-1}$  vor. Hieran schloss sich eine dreitägige Akklimatisierung im Dauerlicht bei gleichen Lichtintensitäten an, bevor alle Pflanzen mit Dexamethason behandelt wurden. 6 h und 24 h nach der Induktion erfolgte die Probennahme von je drei biologischen Replikaten für die Gewinnung von RNA, die angesichts der erforderlichen Reinheit mit dem *InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit* isoliert wurde. Vorerst wurde die Gendeaktivierung von CHLH und CHL27 in den entsprechenden transgenen Linien gegenüber dem Wildtyp mittels qPCR überprüft. Für alle drei CHLH-RNAi-Linien, #7i, #8l und #9g, konnte in Korrelation zu den Mg-Porphyrinmessungen (Abbildung 7A und B) 6 h nach der Dexamethason-Behandlung noch keine Reduktion der CHLH-Genexpression verzeichnet werden (Abbildung 10A). Dafür aber waren 24 h nach der Induktion die CHLH-Transkriptgehalte hoch signifikant verringert, für die Linie #8l um 90 % relativ zum Wildtyp (Abbildung 10A). Die infolge des dexamethasoninduzierten RNAi-Effektes resultierende Gen-Stilllegung von CHL27 war demgegenüber in der CHL27-RNAi-Linie #21j bereits deutlich nach 6 h zu beobachten (Abbildung 10B). Nach 24 h war der CHL27-Transkriptgehalt der Mutante auf unter 20 % des Wildtypniveaus gesunken. Eine Untersuchung des Phänotyps der am stärksten inaktivierten transgenen Linien zeigte fünf Tage nach Induktion für die CHLH-RNAi-Linie #8l die zu erwartenden Chlorosen, während für die CHL27-RNAi-Linie #21j eine Retardierung im Wachstum sowie nekrotische Läsionen festgestellt wurden (Abbildung 10C). Der Wildtyp zeigte sich durch die Dexamethason-Behandlung unbeeinträchtigt. Die RNA-Proben der CHLH-RNAi-Linie #8l und der CHL27-RNAi-Linie #21j nach 24-stündiger Dexamethason-Behandlung wurden schließlich für eine Microarray-Analyse unter Verwendung des

*GeneChip® Arabidopsis ATH1 Genome Arrays* bestimmt. Die Qualitätskontrolle der RNA sowie die Hybridisierung erfolgte durch das Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (UK). In Analogie zu den *CHLH*- und *CHL27*-RNAi-Linien wurde zusätzlich ein induzierbares RNAi-Transgenkonstrukt zur Deaktivierung von *CHLM*, das für die Methyltransferase kodiert, durch Hagen Schlicke generiert. Eine RNAi-Linie, die auf die Luciferase des Leuchtkäfers abzielt, diente als Kontrolle, um mögliche Sekundäreffekte des RNAi-Systems aufzudecken. Unter Einbeziehen der Kontroll-Linie und der obigen transgenen Linien wurden in nachfolgenden Experimenten die vergleichenden Transkriptomanalysen durchgeführt (Schlicke *et al.*, 2014).



**Abbildung 10:** Vorbereitende Experimente für eine globale Transkriptanalyse. *Arabidopsis* Wildtyp (Col-0), die drei *CHLH*-RNAi-Linien #7i, 8l und 9g sowie die *CHL27*-RNAi-Linie #21j wurden für knapp drei Wochen unter Kurztagbedingungen (10 h Licht) und  $110 \mu\text{mol Photonen m}^{-1} \text{s}^{-1}$  angezogen. Nach einer dreitägigen Akklimatisierung im Dauerlicht erfolgte die Behandlung mit  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  Dexamethason. Die Geninaktivierung von (A) *CHLH* bzw. (B) *CHL27* in den transgenen Linien gegenüber dem Wildtyp wurde 6 h und 24 h nach Induktion mittels qPCR überprüft. Als Referenzgen diente *Tubulin*. (C) Nach weiteren fünf Tagen nach der Dexamethason-Behandlung zeigten sich für die jungen Pflanzen der *CHLH*-RNAi-Linie #8l der bekannte chlorotische Phänotyp und für die Pflanzen der *CHL27*-RNAi-Linie ein retardierter Wuchs und nekrotische Läsionen. (\*\*) Sehr signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,01$

Im weiteren Verlauf wurden die Experimente zu diesem Projekt im Rahmen einer Projektneuverteilung beendet und ein neuer Fokus auf die Untersuchung von photoautotrophen *Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen hinsichtlich ihrer Eignung als Modellsystem für eine spätere biopharmakologische Nutzung untersucht.

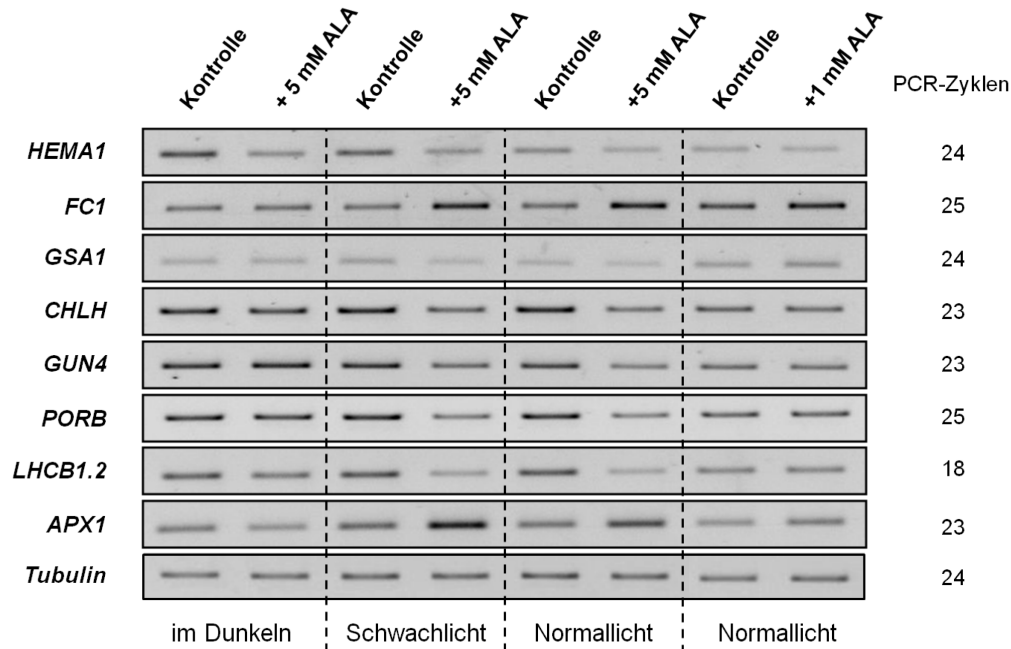
### **3.2 Untersuchungen von photoautotrophen Zellsuspensionskulturen von *Arabidopsis* auf ihre Anwendbarkeit für Studien schneller Signalantworten**

Pflanzliche photoautotrophe Zellsuspensionskulturen (PASK) stellen im Vergleich zu den üblichen, differenzierten, verschiedenste Gewebe- und Zelltypen aufweisenden Modellpflanzen ein sehr nützliches Modellsystem dar. Ein entscheidender Vorteil der PASK besteht in ihrer stark einheitlichen Zellpopulation, die gleichzeitig und unmittelbar den von außen applizierten Stimuli ausgesetzt wird, sodass eine reproduzierbare Analyse kurzfristig induzierter Signalprozesse möglich ist. Die in dieser Arbeit untersuchten PASK von *Arabidopsis* wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Thomas Roitsch (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Vorhergehende Analysen der Wachstumsparameter und Photosyntheseleistungen der PASK von *Arabidopsis* bestätigten vergleichbare physiologische Eigenschaften zu photoautotrophen Zellkulturen anderer Pflanzenspezies (Hampp *et al.*, 2012). Obendrein zeigten vergleichende Quantifizierungen absoluter Metabolitkonzentrationen und Western-Blot-Analysen chlorophyll- und photosyntheserelevanter Proteine, dass die in den PASK detektierten Level ähnlich jener in den Blättern von jungen *Arabidopsis*-Keimlingen sind (Hampp *et al.*, 2012).

Für alle experimentellen Durchführungen wurden die PASK in speziell angefertigten Doppelstock-Erlenmeyerkolben angezogen (Abbildung 11A). Korrelierend mit der maximalen Verdopplungszeit und der maximalen Sauerstoffentwicklung zehn bzw. sieben Tage nach Subkultivierung (Hampp *et al.*, 2012), war die stärkste Chlorophyllakkumulation zwei Wochen nach Subkultivierung zu verzeichnen (Abbildung 11B). Nach 21 Tagen sanken die physiologischen Aktivitäten drastisch, sodass alle weiteren Versuche maximal zwei Wochen nach Subkultivierung durchgeführt wurden. Die PASK von *Arabidopsis* wurden in dieser Arbeit auf ihre Eignung für Studien zur schnellen Signalgebung, im Speziellen retrograder Signale, hin untersucht. Hierzu dienten Experimente, in denen PASK mit Chlorophyllvorstufen (z.B. ALA, Proto, MgProto), Häm und verschiedenen Inhibitoren der Tetrapyrrolbiosynthese, wie Acifluorfen, 2,2'-Dipyridyl und Gabaculin, behandelt wurden.



Nagai *et al.*, 2007), ist eine durch den ALA-Überschuss bedingte Bildung von ROS denkbar. Hierzu korrelierend wurden um knapp 30 % gesteigerte Proto-Akkumulationen in den ALA-gefütterten PASK im Schwachlicht und im Normallicht detektiert (nicht dargestellt).

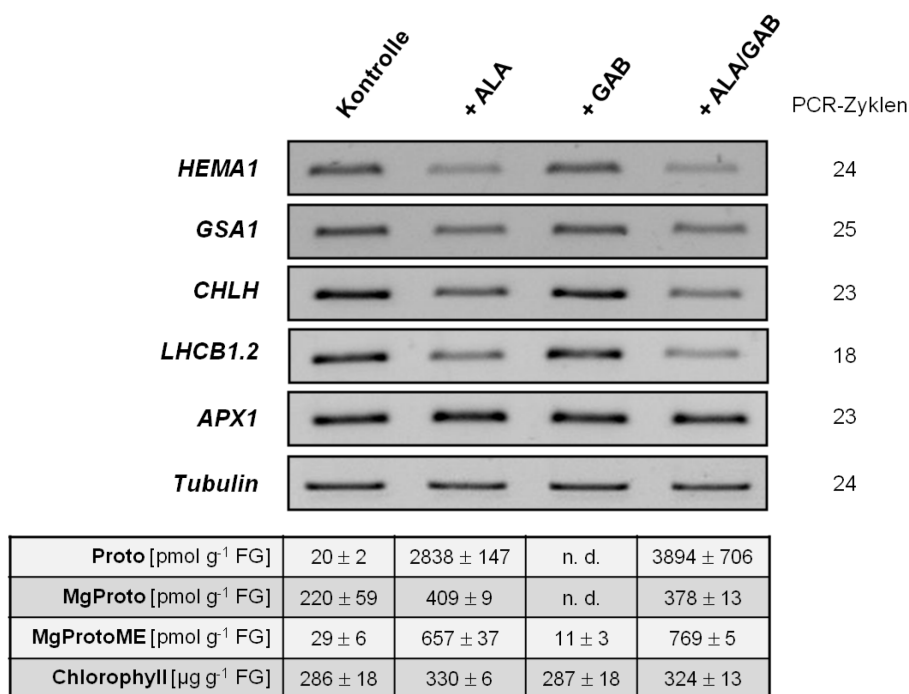


**Abbildung 12:** Semiquantitative Expressionsanalyse tetrapyrrolbiosyntheserelevanter Gene in ALA-gefütterten PASK unter verschiedenen Lichtbedingungen. 5 mM ALA wurde für 6 h im Dunkeln, im Schwachlicht ( $15\text{--}20\ \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) oder im Normallicht ( $100\ \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) bzw. 1 mM ALA für 6 h im Normallicht appliziert. Unbehandelte PASK dienten als Kontrolle. Zusätzlich zu den Genen, die Enzyme der Tetrapyrrolbiosynthese kodieren, wurden die Transkriptgehalte von *LHCB1.2* und *APX1* analysiert. *LHCB1.2* kodiert für ein chlorophyllbindendes Protein und das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -responsive Gen *APX1* kodiert für eine zytosolische Ascorbat-Peroxidase. Das *Tubulin* (*TUA5*)-Transkript wurde als interne Kontrolle für die Verwendung gleicher cDNA-Mengen verwendet.

Ergänzend zu den ALA-Fütterungen wurde die Synthese von ALA blockiert, indem PASK mit Gabaculin behandelt wurden, das irreversibel die Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase hemmt. Interessanterweise wiesen die Zellen die allein mit 5 mM ALA oder in Kombination mit  $50\ \mu\text{M}$  Gabaculin inkubiert wurden, ausschließlich eine durch ALA hervorgerufene Reduktion der Transkriptlevel nukleärer, tetrapyrrol- und photosyntheserelevanter Gene auf (Abbildung 13, oben). Die kurzzeitige Applikation von Gabaculin führte zu keinen Veränderungen der detektierten mRNA-Gehalte, obgleich eine leichte Verringerung der Porphyrin- und Mg-Porphyringehalte verzeichnet wurde. Gleiches galt auch für höhere Konzentrationen von  $200\ \mu\text{M}$  Gabaculin, die über sechs Stunden appliziert wurden (Daten nicht gezeigt). In höheren Pflanzen resultiert die ALA-Behandlung bekanntermaßen in einer Akkumulation der Tetrapyrrolintermediate Proto, MgProto und MgProtoME. In ähnlicher Weise war ein starker Anstieg der *steady-state*-Gehalte dieser Porphyrine in den PASK nach

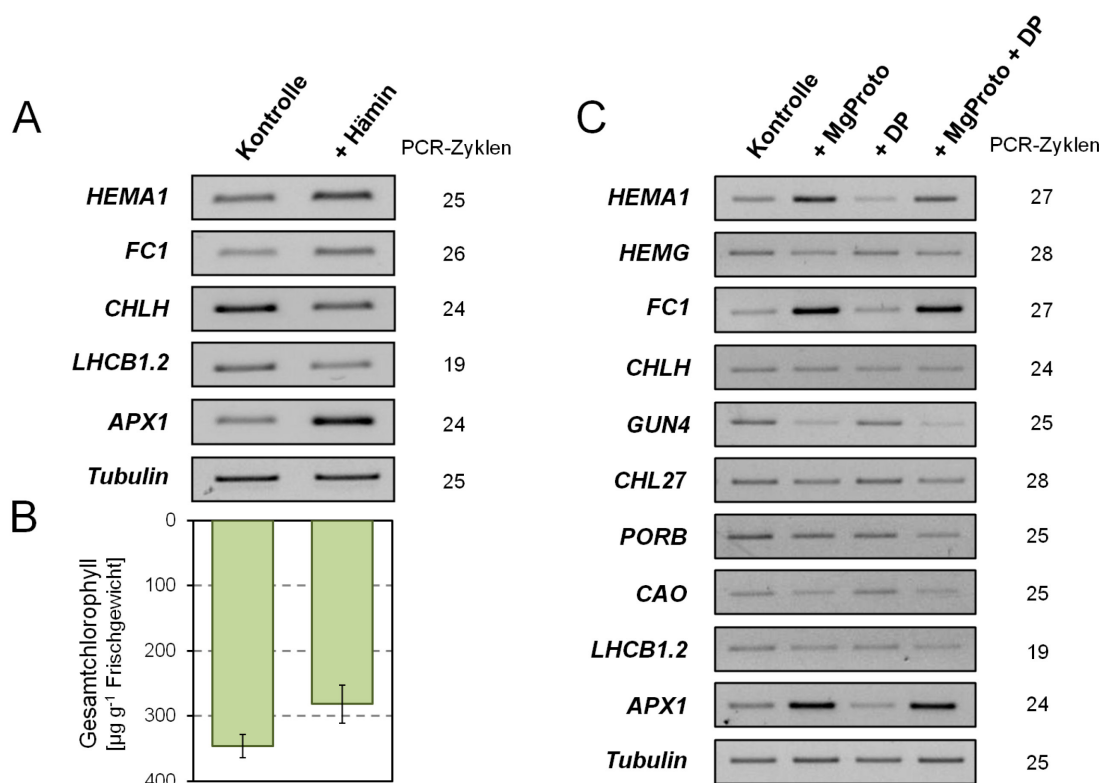


ALA-Fütterung zu beobachten (Abbildung 13, unten). Zudem war nach der Behandlung mit ALA auch der Chlorophyllgehalt leicht erhöht, obwohl die Transkripte für *CHLH* und *LHCB1.2* reprimiert waren.



**Abbildung 13:** Vergleichende Analyse der Transkriptgehalte einer Auswahl an tetrapyrrol- und photosyntheserelevanten Genen mittels semiquantitativer PCR sowie der Gehalte von Porphyrinen und Chlorophyll in PASK, die allein oder in Kombination mit ALA und Gabaculin (GAB) gefüttert wurden. Für 6 h wurden 5 mM ALA und/oder 50 µM GAB unter normalen Lichtbedingungen appliziert. Unbehandelte PASK dienten als Kontrolle.

Da Häm einen wichtigen Feedback-Regulator früher Tetrapyrrolbiosyntheseschritte darstellt und als potenzielles Signalmolekül retrograder Kommunikation diskutiert wird (Goslings *et al.*, 2004; Beale, 2011), wurden entsprechende Fütterungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde Hämin, dessen gebundenes Fe<sup>3+</sup>-Atom gegenüber dem Fe<sup>2+</sup> im Häm eine höhere Stabilität in Lösungen gewährt, über sechs Stunden unter Normallichtbedingungen appliziert. Die Behandlung mit 10 µM Hämin bewirkte zunächst keine Veränderungen im Transkriptgehalt tetrapyrrol- und photosyntheserelevanten Gene über einen Zeitraum von 2 bis 24 h (Daten nicht gezeigt). Wurde allerdings die zehnfache Menge eingesetzt, so konnte im Vergleich zur Kontrolle eine leichte Induktion der nukleären Genexpression für Schlüsselenzyme des Fe-Zweiges der Tetrapyrrolbiosynthese (GluTR, Fe-Chelatase) nachgewiesen werden (Abbildung 14A). Im Gegenzug wurde der Mg-Zweig der Tetrapyrrolbiosynthese herunter reguliert, stellvertretend gezeigt für *CHLH*, was sich sogleich in einer 20 %igen Reduktion des Chlorophyllgehaltes widerspiegelte (Abbildung 14B).



**Abbildung 14:** Effekte einer Hämin- sowie MgProto- und/oder 2,2'-Dipyridyl-Behandlung auf die Expression tetrapyrrol- und photosyntheserelevanter Gene und den Chlorophyllgehalt in PASK. Für sechs Stunden wurden PASK unter Normallichtbedingungen mit 100  $\mu\text{M}$  Hämin inkubiert und (A) die Transkriptgehalte von Genen, die für Schlüsselenzyme der Tetrapyrrolbiosynthese, einen Stellvertreter der chlorophyllbindenden Proteine und eine zytosolische Ascorbat-Peroxidase kodieren, analysiert. (B) Nach der Hämin-Fütterung war ein reduzierter Gesamtchlorophyllgehalt im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Die Kontrolle wurde mit dem Lösungsmittel DMSO (1:126) versetzt. (C) Nach einer zweistündigen Behandlung der PASK allein oder in Kombination mit dem Chlorophyllintermediat MgProto (20  $\mu\text{M}$ ) und dem Hemmstoff 2,2'-Dipyridyl (DP; 2 mM) unter Normallichtbedingungen wurden die Expressionen tetrapyrrol- und photosyntheserelevanter Gene mittels semiquantitativer PCR untersucht. Die Kontrolle wurde mit den Lösungsmitteln Ethanol (1:1250) und Methanol (1:110) behandelt.

Behandlungen mit MgProto und dem Hemmstoff 2,2'-Dipyridyl erweiterten die Analysen schneller Signalantworten. 2,2'-Dipyridyl als Chelator bildet speziell mit Eisen stabile Komplexe, sodass Hydroxylierungsreaktionen inhibiert werden, wie zum Beispiel jene durch die Cyclase oder Fe-Chelatase katalysierten Reaktionen. Expressionsanalysen mittels semiquantitativer PCR verdeutlichten zum einen eine signifikante Hochregulation der Gene, die für die GluTR und Fe-Chelatase kodieren, bereits zwei Stunden nach MgProto-Applikation (Abbildung 14C). Die *GUN4*- und *CAO*-Transkripte waren nach MgProto-Fütterung weniger abundant. Zum anderen führte die 2,2'-Dipyridyl-Behandlung wiederum zu reduzierten *HEMA1*-Transkriptgehalten. Die Expressionen von *FC1* und *CHL27*, deren Genprodukte direkt durch 2,2'-Dipyridyl gehemmt werden, waren im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Die simultane Fütterung mit MgProto und 2,2'-Dipyridyl hatte einen

kombinierten Effekt zur Folge, der sich vor allem durch stark erhöhte *steady-state*-Gehalte von Proto, MgProto und MgProtoME auszeichnete (Tabelle 20).

**Tabelle 20:** Quantifizierung der Porphyrin- und Mg-Porphyringehalte in PASK nach zweistündiger Behandlung mit dem Chlorophyllintermediat MgProto (20  $\mu$ M) und/oder dem Hemmstoff 2,2'-Dipyridyl (DP; 2 mM). Die Kulturen wurden unter Normallichtbedingungen inkubiert. Die Kontrolle wurde parallel mit den Lösungsmitteln Ethanol (1:1250) und Methanol (1:110) versetzt. (n. d.) nicht detektierbar

	Proto	MgProto	MgProtoME
	pmol g <sup>-1</sup> Frischgewicht		
Kontrolle	58,8 $\pm$ 33,3	n. d.	36,7 $\pm$ 26,6
+ 20 $\mu$ M MgProto	1992 $\pm$ 38,8	42.484 $\pm$ 1823	4083 $\pm$ 1379
+ 2 mM DP	53,0 $\pm$ 16,5	388 $\pm$ 377	673 $\pm$ 63,3
+ MgProto + DP	3098 $\pm$ 245	68.280 $\pm$ 2253	123.333 $\pm$ 15.969

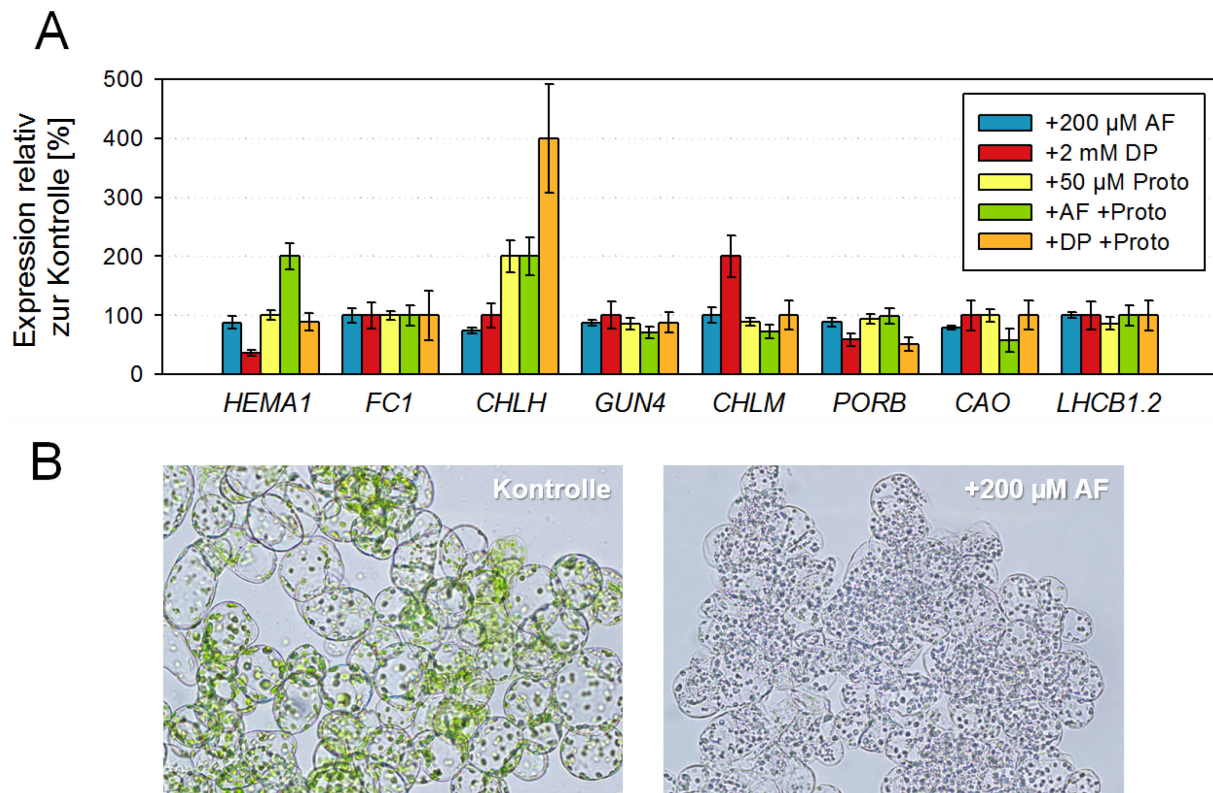
Final wurden zusätzlich der inhibitorische Effekt von Acifluorfen und die Auswirkungen einer alleinigen oder kombinierten Proto-Fütterung mit Acifluorfen oder 2,2'-Dipyridyl untersucht. Acifluorfen ist ein spezifischer Inhibitor der Protoporphyrinogen-IX-Oxidase, sodass eine Akkumulation von Protoporphyrinogen IX bewirkt wird, welches allerdings unter normalem Luftsauerstoff direkt zu Proto oxidiert. Messungen der *steady-state*-Gehalte nach vierstündiger Applikation von 200  $\mu$ M Acifluorfen bestätigten eine über 70-fache Anreicherung von Proto gegenüber der Kontrolle und eine dazu korrelierende Reduktion der MgProtoME- und Protochlid-Gehalte (Tabelle 21).

**Tabelle 21:** Quantifizierung der Chlorophyllvorstufen- und Chlorophyllgehalte in PASK nach vierstündiger Behandlung mit den Tetrapyrrolbiosynthese-Inhibitoren Acifluorfen (AF; 200  $\mu$ M) oder Dipyridyl (DP; 2 mM) und/oder dem Chlorophyllintermediat Proto (50  $\mu$ M). Die Kulturen wurden unter Normallichtbedingungen inkubiert. Die Kontrolle wurde parallel mit den Lösungsmitteln Aceton (1:1000) und DMSO (1:126) versetzt. (n. d.) nicht detektierbar; (ü. D.) über der Detektionsgrenze

	Proto	MgProto	MgProtoME	Protochlid	Chlorophyll
	pmol g <sup>-1</sup> FG				$\mu$ g g <sup>-1</sup> FG
Kontrolle	19,1 $\pm$ 3,5	n. d.	59,9 $\pm$ 7,3	63,6 $\pm$ 1,7	103 $\pm$ 12
+ 200 $\mu$ M AF	1416 $\pm$ 185	n. d.	15,6 $\pm$ 1,8	26,1 $\pm$ 1,3	90,4 $\pm$ 6,0
+ 2 mM DP	90,8 $\pm$ 84,6	24,5 $\pm$ 2,1	1684 $\pm$ 101	239 $\pm$ 30	87,8 $\pm$ 3,2
+ 50 $\mu$ M Proto	ü. D.	6,6 $\pm$ 0,7	87,1 $\pm$ 16,6	254 $\pm$ 48	101 $\pm$ 4,5
+ AF + Proto	ü. D.	n. d.	28,9 $\pm$ 12,5	58,3 $\pm$ 5,6	101 $\pm$ 12
+ DP + Proto	ü. D.	8,1 $\pm$ 4,3	2236 $\pm$ 89	250 $\pm$ 64	92,9 $\pm$ 16,2

Interessanterweise waren die Transkriptgehalte tetrapyrrol- und photosyntheserelevanter Gene nach einer vierstündigen Acifluorfen-Behandlung nicht signifikant verändert, während eine Fütterung mit Proto über den gleichen Zeitraum zumindest zu einer erhöhten *CHLH*-

Expression führte (Abbildung 15A). Alternativ wurde eine längere, 20-stündige Kultivierung der PASK mit Acifluorfen getestet, die zur Vermeidung phototoxischer Schädigungen im Dunkeln durchgeführt wurde. Hierbei zeigten sich auch kaum veränderte Expressionen der tetrapyrrol- und photosyntheserelevanten Gene, darunter auch *HEMA1*, das für die Protoporphyrinogen-IX-Oxidase kodiert. Lediglich *PORB*-Transkriptabundanzen waren unter diesen getesteten Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle verringert (Daten nicht gezeigt). Frühere Versuche, die drastische Akkumulationen von Chlorophyllintermediaten binnen 15 Minuten nach Acifluorfen-Zugabe nachwiesen, zeugten aber bereits von einer sofortigen Aufnahme des Hemmstoffes (Hampp *et al.*, 2012). Ein Ausbleichen der Acifluorfen-behandelten PASK konnte drei Tage nach der Applikation beobachtet werden (Abbildung 15B). Es ist anzunehmen, dass photooxidativer Stress durch die Proto-Akkumulationen infolge der Acifluorfen-Behandlung das Ausbleichen bedingte.



**Abbildung 15:** Auswirkungen einer Acifluorfen-, Dipyridyl- und/oder Proto-Behandlung auf die Expression photosyntheserelevanter Gene und den Phänotyp der PASK. (A) Für vier Stunden wurden PASK unter Normallichtbedingungen mit 200 µM Acifluorfen (AF) oder 2 mM 2,2'-Dipyridyl (DP) und/oder 50 µM Proto inkubiert. Die Kontrolle wurde entsprechend mit den Lösungsmitteln Aceton (1:1000) und DMSO (1:126) behandelt. Relativ zur Kontrolle, deren Messwerte 100 % entsprechen, wurden die Transkriptgehalte von Enzymen der Tetrapyrrolbiosynthese und einem chlorophyllbindenden Protein mittels qPCR analysiert. (B) Lichtmikroskopische Aufnahmen von PASK (40-fache Vergrößerung) visualisieren das Ausbleichen der mit 200 µM Acifluorfen (AF) behandelten und unter Dauerlicht kultivierten Zellen nach drei Tagen im Vergleich zur Kontrolle.

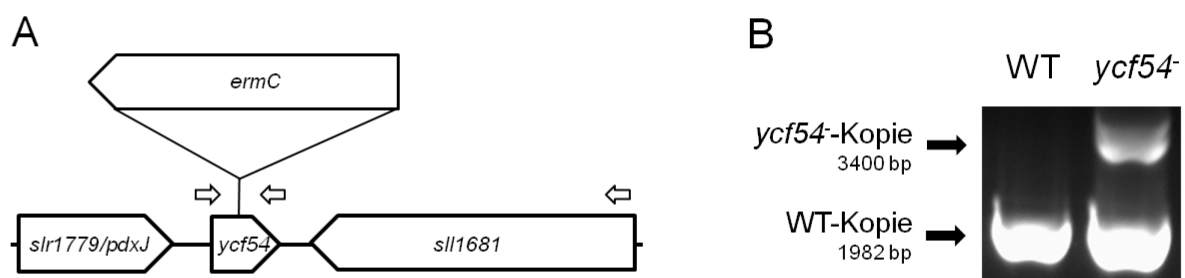
Ergänzend sei hervorzuheben, dass die Beobachtungen der semiquantitativen PCRs aus Abbildung 14C zu einer reduzierten *HEMA1*-Expression nach erfolgter 2,2'-Dipyridyl-Behandlung durch die qPCR-Daten verifiziert werden konnten (Abbildung 15A). Darüber hinaus war eine im Vergleich zur Kontrolle zweifach erhöhte *CHLM*-Expression sowie eine leichte Verringerung der *PORB*-Expression zu verzeichnen. Gesteigerte *HEMA1*- und *CHLH*-Transkriptgehalte sind eher das Resultat der Proto-Fütterung.

Abschließend kann festgehalten werden, dass durch kurzzeitige Fütterungsexperimente sofortige Dysregulationen oder Inaktivierungen der Tetrapyrrolbiosynthese der PASK detektiert werden konnten. Dies bestätigten Akkumulationen von Chlorophyllintermediaten und nachfolgende Veränderungen in den Transkriptgehalten von Genen, die plastidenlokalisierte Proteine der Chlorophyll- und Photosynthese kodieren.

### 3.3 Untersuchungen zur Funktion von Ycf54 in *Synechocystis*

Die anfängliche Herangehensweise bestand in der Suche nach Mutanten, die einen Defekt in der Chlorophyllbiosynthese vorzuliegen haben. Es ist davon auszugehen, dass sich solch ein Defekt aufgrund beeinträchtigter Enzymreaktionen durch eine metabolisch bedingte Akkumulation von Intermediaten auszeichnet. Ebenso charakteristisch ist ein reduzierter Chlorophyllgehalt infolge einer über Feedback-Mechanismen verminderten ALA-Synthese, die den ratenlimitierenden Schritt dieses Syntheseweges darstellt (Tanaka & Tanaka, 2007). In diesem Zusammenhang fiel das Augenmerk auf eine Mutante des photosynthetischen Modellorganismus *Synechocystis*, deren Geninaktivierung des hypothetischen chloroplastidären Leserahmens *ycf54* eine Beteiligung des Genproduktes in der Chlorophyllbiosynthese vermuten lässt. Die Mutante wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Masahiko Ikeuchi (Universität Tokio, Japan) zur Verfügung gestellt, der die *Synechocystis* Mutanten-Kollektion von Prof. Teruo Ogawa betreut. Die in dieser Arbeit gezeigten Resultate entstanden unter Zusammenarbeit mit Prof. Annegret Wilde und Dr. Thomas Wallner (Justus-Liebig-Universität Gießen). Die durch die gemeinsame Kooperation erzeugten Ergebnisse trugen zu einem gemeinsamen Manuskript bei, das zur Veröffentlichung eingereicht wurde und der Revision bedurfte. Da parallel die Publikation von Hollingshead *et al.* (2012) erschien, wurde das gemeinsame Manuskript bisher nicht wieder eingereicht. Einzelne Abbildungen dieses Manuskriptes wurden bereits in der Dissertationsschrift von Dr. Thomas Wallner veröffentlicht (Wallner, 2012).

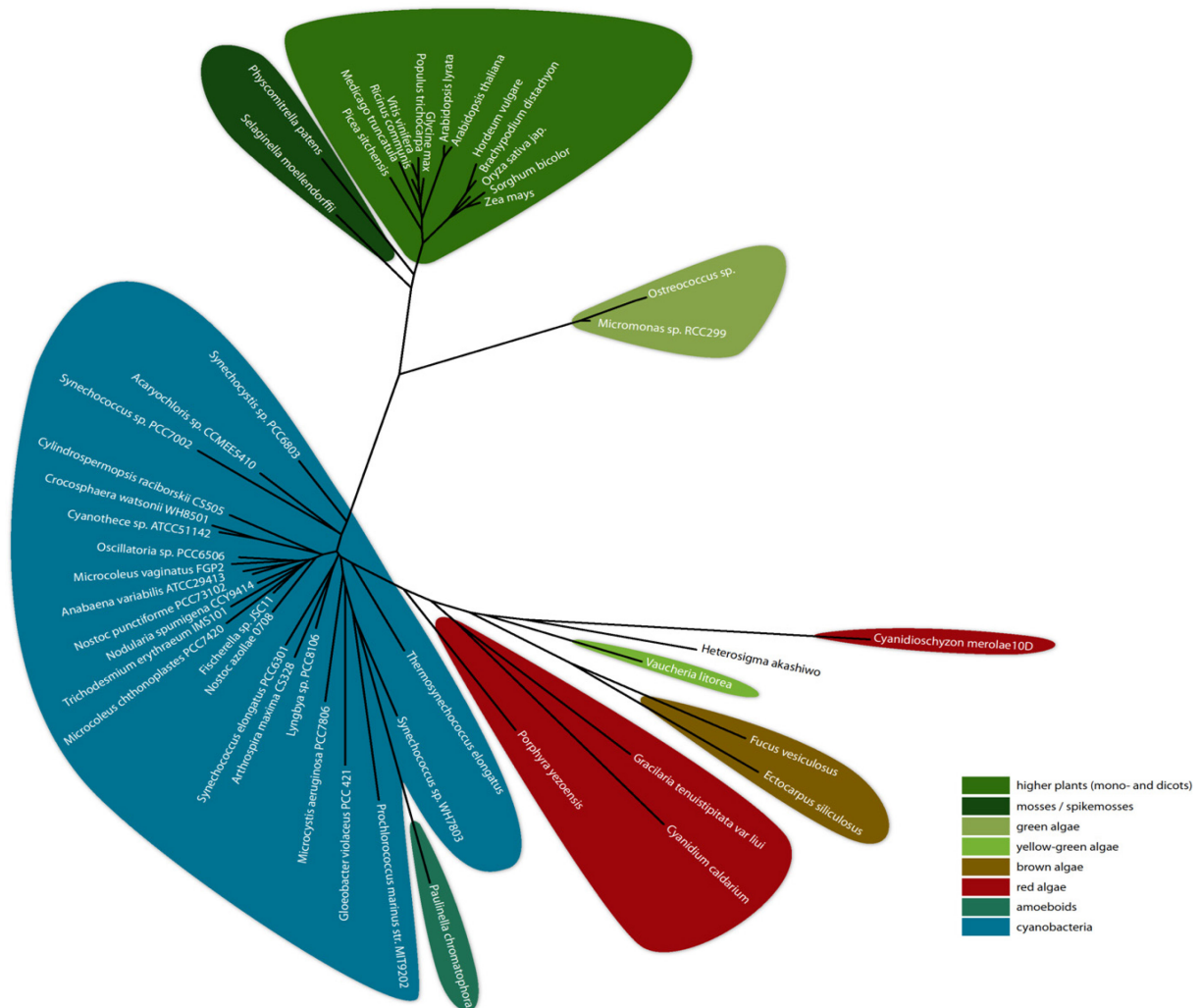
Das *ycf54*-Gen befindet sich im Locus *slr1780* des *Synechocystis*-Genoms (Kaneko *et al.*, 1996a). Über homologe Rekombination wurde durch Integration einer Erythromycin-Resistenzgen-Kassette der Leserahmen von *ycf54* unterbrochen (Abbildung 16A). Zur genaueren Rekonstruktion der Strategie der Insertionsmutagenese wurde eine Sequenzierung des genomischen DNA-Fragmentes durchgeführt, das die *ycf54*-Sequenz umfasst. Hierbei stellte sich heraus, dass die Resistenzgen-Kassette in gegenläufiger Orientierung zum *ycf54*-Gen über die mittels PCR eingefügten Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Bam*HI inseriert wurde (Wallner, 2012). Wie PCR-Analysen bestätigten, konnte keine komplette Segregation der *ycf54*-Mutation erzielt werden (Abbildung 16B; Wallner (2012), Abbildung 26). Vielmehr wurde überwiegend die endogene Wildtyp-Kopie des *ycf54*-Gens der Mutante amplifiziert, sodass lediglich ein Knock-down vorlag und die Mutante nachfolgend als *ycf54<sup>-</sup>* bezeichnet wird.



**Abbildung 16:** Schematische Darstellung der Insertionsmutagenese des *ycf54*-Gens (*slr1780*) aus *Synechocystis* und Nachweis der Segregation. (A) Das Gen *ycf54* (*slr1780*) befindet sich im *Synechocystis*-Genom hinter dem *pdxJ*-Gen (*slr1779*), das für die Pyridoxin-5'-Phosphat-Synthase kodiert. Das *sll1681*-Gen auf dem Gegenstrang kodiert für ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion. Die Inaktivierung des Genlokus *slr1780* erfolgte durch Integration einer Erythromycin-Resistenzgen-Kassette (*ermC*). (B) PCR-Analyse zum Nachweis der Segregation der *ycf54*-Mutation. Genomische DNA, extrahiert aus Wildtyp (WT) und selektiertem Mutantenklon, wurde mit der Primerkombination *ycf54*-seq-fw und *sll1681*-rev (Tabelle 29) amplifiziert. Kürzere DNA-Fragmente entsprechen hierbei der Wildtyp-Kopie des *ycf54*-Gens, längere der mutierten Variante. Die Grafik wurde im Rahmen der Kooperation von Dr. Thomas Wallner erstellt (Wallner, 2012).

Das Genprodukt von *ycf54* ist ein 12,2 kDa großes Protein, dessen Homolog in allen bis dato sequenzierten Genomen aerober Organismen, die oxygene Photosynthese betreiben, gefunden werden konnte. Unter Zuhilfenahme des BLAST P Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) zeigten Sequenzvergleiche die Ähnlichkeit von Ycf54-Proteinen innerhalb der verschiedenen Gruppen photoautotropher Organismen auf. Demnach scheint in allen Genomsequenzen von Cyanobakterien, Mosen, Algen und Pflanzen ein einzelnes Gen vorzuliegen (Abbildung 17). Ycf54 von *Synechocystis* und das homologe Protein von *Arabidopsis* sowie von *Oryza sativa* besitzen zu 47 % identische Aminosäuren. Allen Homologen gemein ist die sogenannte

Ycf54-Domäne (auch als DUF2488 in der Pfam-Datenbank bezeichnet, <http://pfam.sanger.ac.uk/>), jedoch gibt es keine Ähnlichkeiten zu anderen nicht-orthologen Proteinen und eine gewisse Funktion kann dieser Domäne anhand der Proteinstruktur nicht zugeordnet werden.



**Abbildung 17:** Phylogenetischer Baum von Ycf54. Repräsentative Sequenzen von Ycf54 entstammen der Software GenBank unter Verwendung des BLAST P Algorithmus (blastp / <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) und der redundanzfreien Protein-Sequenzdatenbank mit Ycf54 aus *Synechocystis* als Suchanfrage. Die Berechnung und Darstellung des Dendrogramms erfolgte mit den Programmen BEAST v1.6.2 (Drummond & Rambaut, 2007) und FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) in Zusammenarbeit mit Andreas Richter.

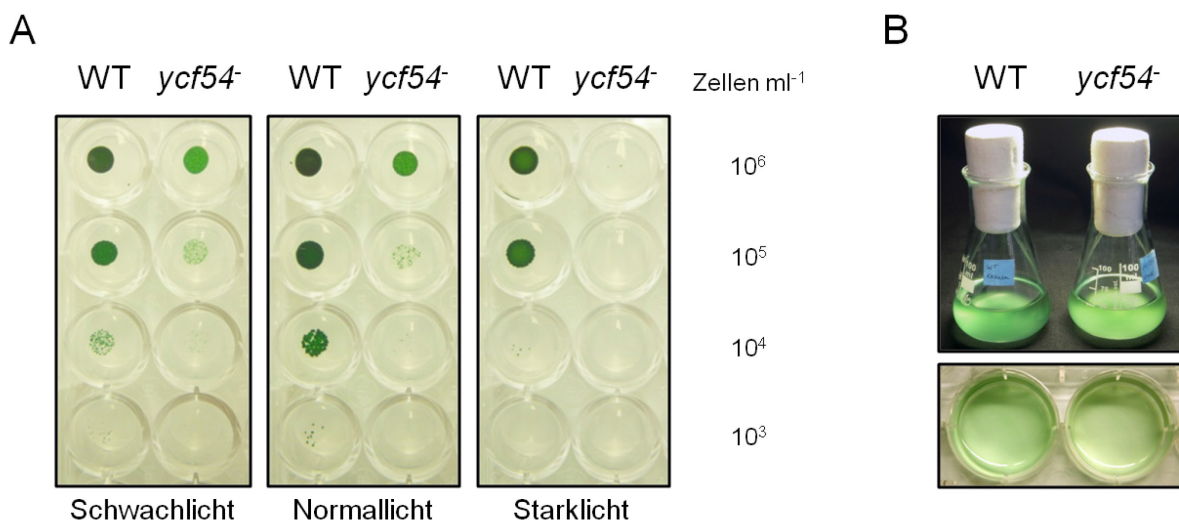
Für das Cyanobakterium *Anabaena* sp. PCC 7120 ist bei der PDB Datenbank unter der Nummer 3JSR die Kristallstruktur des Ycf54-Homologs hinterlegt (unveröffentlicht), die allerdings auch keine weiteren Schlüsse auf die funktionale Rolle von Ycf54 erlaubt. Basierend auf dem globalen Expressionsprofil von *Synechocystis* (Mitschke *et al.*, 2011) wird *ycf54* höchstwahrscheinlich zusammen in einem Operon mit dem stromaufwärts gelegenen



offenen Leserahmen *slr1779* exprimiert. *Slr1779* ist als *pdxJ* annotiert (Kaneko *et al.*, 1996a) und kodiert für die Pyridoxin-5'-phosphat-Synthase, ein Protein das mutmaßlich in der Biosynthese von Vitamin B<sub>6</sub> involviert ist (Garrido-Franco, 2003). Interessanterweise dient das Endprodukt der Vitamin B<sub>6</sub> Biosynthese Pyridoxal-5'-phosphat der ALA-Synthase als Cofaktor (Davies & Neuberger, 1979a; Davies & Neuberger, 1979b).

### 3.3.1 Phänotypische Charakterisierung der *ycf54*-Mutante

Um folglich erste Hinweise auf die funktionellen Eigenschaften des *ycf54*-Genproduktes in *Synechocystis* zu gewinnen, wurde zunächst eine phänotypische Charakterisierung der *ycf54*-Mutante vorgenommen. Vorversuche zeigten, dass *ycf54* kein Starklicht toleriert. Mittels eines Zellkulturplatten-Assays (Abbildung 18A) wurde das Wachstumsverhalten der *ycf54*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp bei verschiedenen Lichtintensitäten analysiert.



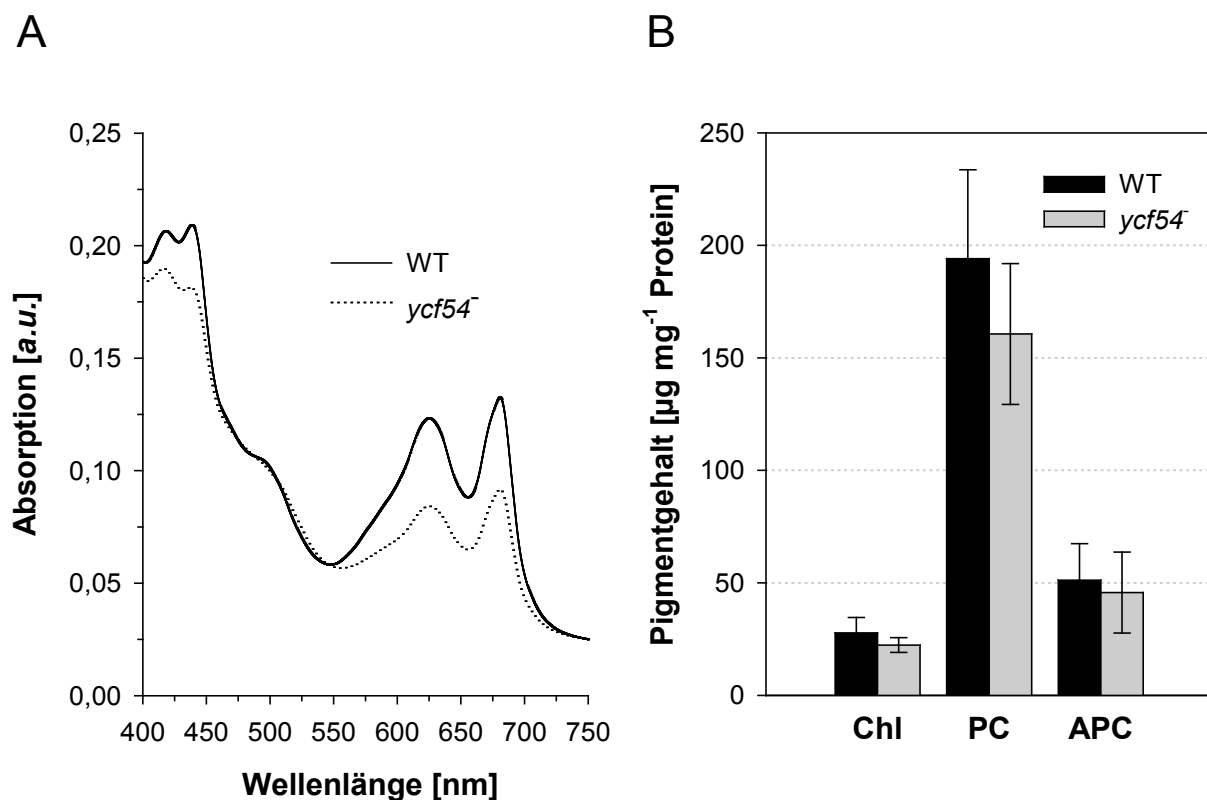
**Abbildung 18:** Wachstumsanalyse von Wildtyp-(WT-) und *ycf54*-Zellen im Zellkulturplatten-Assay sowie Anzucht in Flüssigkultur unter Schwachlichtbedingungen. (A) Von WT- und *ycf54*-Kulturen, die für 3 Tage unter Schwachlichtbedingungen angezogen wurden, ist eine Verdünnungsreihe dargestellt. Jeweils 7  $\mu$ l der rechts angegebenen vier Verdünnungsstufen wurden auf festem BG11-Medium pipettiert. Das Wachstum der Zellen erfolgte für weitere 14 Tage unter Schwachlicht- (12  $\mu$ mol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Normallicht- (40  $\mu$ mol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Starklichtbedingungen (120  $\mu$ mol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (B) Flüssigkulturen von WT und *ycf54* in Erlenmeyerkolben (oben) und 6-well Zellkulturplatten (unten) nach einwöchiger Anzucht unter Schwachlichtbedingungen. Die Zellen wurden auf eine gemeinsame OD<sub>750nm</sub> = 0,6 verdünnt.

Das Auftragen unterschiedlicher Verdünnungsstufen der beiden Kulturen ermöglichte einen optimalen Vergleich. Bereits ab einer Verdünnung von 10<sup>5</sup> Zellen  $\text{ml}^{-1}$  zeichnete sich eine deutliche Verminderung der Überlebensrate für *ycf54* unter Schwachlichtbedingungen und drastischer unter Normallichtbedingungen ab. Starklichtbedingungen von 120  $\mu$ mol Photonen



$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  erlaubten der Mutante erst gar kein Wachstum. Neben dem verzögerten Wachstum weist die Mutante unter photoautotrophen Bedingungen bei gleicher optischer Dichte im Vergleich zum Wildtyp einen blassgrünen Phänotyp auf (Abbildung 18B). Die *ycf54*-Mutante wächst am besten bei  $15 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in BG11-Medium ohne zusätzliche Glukose-Zugabe. Für alle weiteren Versuche wurden demzufolge die Kulturen unter diesen Bedingungen angezogen.

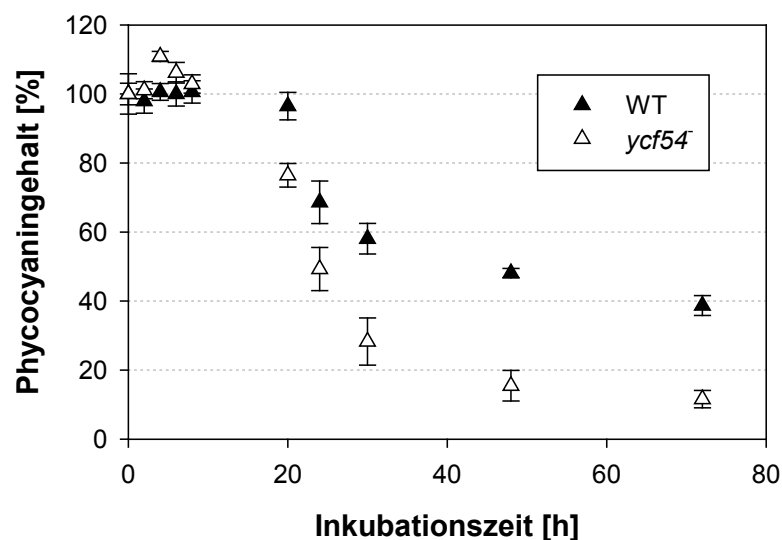
Um im Folgenden Unterschiede in den Pigmentgehalten zu überprüfen, wurden Absorptionsspektren aufgenommen sowie durch Dr. Thomas Wallner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Annegret Wilde (Justus-Liebig-Universität Gießen) Chlorophyll-, Phycocyanin- und Allophycocyaningehalte quantifiziert (Wallner (2012), Tabelle 9).



**Abbildung 19:** Phänotyp des *ycf54*-Knock-downs. (A) Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis* Wildtyp (WT) und *ycf54*, die photoautotroph in BG11-Medium unter Schwachlichtbedingungen kultiviert wurden. Die Zellen wurden auf eine gemeinsame  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,4$  verdünnt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem UV-2401PC Spektrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Die Peaks bei 625 nm und 685 nm repräsentieren die Absorptionsmaxima von Phycocyanin und Chlorophyll *a*. *a.u.* = *arbitrary units*. (B) Akkumulation photosynthetischer Pigmente (Chl, Chlorophyll; PC, Phycocyanin; APC, Allophycocyanin) von *Synechocystis* WT- und *ycf54*-Zellen, die im Rahmen der Kooperation durch Dr. Thomas Wallner (AG Prof. Wilde, Justus-Liebig-Universität) quantifiziert wurden (Wallner (2012), Tabelle 9). Die Anzucht erfolgte unter photoautotrophen Schwachlichtbedingungen ( $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in BG11-Medium.

Wie aus dem Vergleich der Absorptionsspektren vom Wildtyp und *ycf54* hervorgeht (Abbildung 19A), führt ein Knock-down des *ycf54*-Genproduktes zu keiner Veränderung des Verhältnisses der Absorptionsmaxima von Phycocyanin bei 635 nm und Chlorophyll bei 680 nm. Ferner zeigten die Pigmentbestimmungen, dass gleichzeitig sowohl die Gehalte von Phycocyanin als auch von Chlorophyll in *ycf54* verringert sind (Abbildung 19B). Die 20 %ige Reduktion im Chlorophyllgehalt spiegelt sich zudem auch im blassgrünen Phänotyp der *ycf54*-Kultur wider (vgl. Abbildung 18B).

Unter Berücksichtigung, dass generell Phycobilisomen, bzw. Phycobiliproteine unter Stickstoffmangel abgebaut werden (Allen & Smith, 1969; Yamanaka & Glazer, 1980) und *ycf54* ohnehin einen Phycocyaninmangel aufweist (Abbildung 19B), wurden *ycf54*-Zellen zusammen mit Kontrollzellen einer Kinetik bei Anzucht in stickstofffreiem BG11-Medium unterzogen (Abbildung 20). Bereits nach 20 h unter Stickstoffmangel zeigte sich für die Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine um 20 % gesteigerte Abnahme im relativen Phycocyaningehalt. Nach drei Tagen lag der in den *ycf54*-Zellen gemessene relative Gehalt von Phycocyanin lediglich bei etwa 10 %, bei Wildtyp-Zellen zum gleichen Zeitpunkt hingegen noch bei knapp 40 %. Stickstoffmangel scheint demzufolge in *ycf54* eine verstärkte Phycobilisomen-Degradation zu induzieren.



**Abbildung 20:** Graduelle Abnahme der Phycocyaningehalte nach Stickstoffmangelanzucht von Wildtyp- und *ycf54*-Kulturen. Flüssigkulturen von Wildtyp (WT) und *ycf54* wurden zunächst zwei Wochen photoautotroph unter Schwachlichtbedingungen in normalem BG11-Medium angezogen, anschließend mehrmals mit stickstofffreiem BG11-Medium gewaschen und weitere drei Tage unter Stickstoffmangel kultiviert. Für die Kinetik wurden alle Kulturen auf den gleichen Chlorophyllgehalt von  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  verdünnt. Nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 20 h, 24 h, 30 h, 48 h und 72 h erfolgte eine Probenentnahme zur Quantifizierung der Phycocyaningehalte.

### 3.3.2 *ycf54* akkumuliert das Substrat der Cyclase

Interessante Ergebnisse lieferten anschließende quantitative Analysen der *steady-state*-Gehalte von Chlorophyllvorstufen, die während der Tetrapyrrolbiosynthese gebildet werden. Im Vergleich zum Wildtyp akkumulierten Zellen von *ycf54* unter gleichen Anzuchtbedingungen massive Mengen des Cyclase-Substrats MgProtoME. In der Mutante sind etwa 60-fach erhöhte Gehalte an MgProtoME zu verzeichnen (Tabelle 22). Die Gehalte der Intermediate ProtoIX und MgProto sind im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert (Tabelle 22). Die Anreicherung von MgProtoME lässt eine Beeinträchtigung in dem Cyclase-Enzymschritt vermuten. Korrespondierend dazu ist das *steady-state*-Level von Protochlid, das Produkt der Cyclase-Reaktion, um 60 % in der *ycf54*-Mutante gegenüber zum Wildtyp verringert (Tabelle 22).

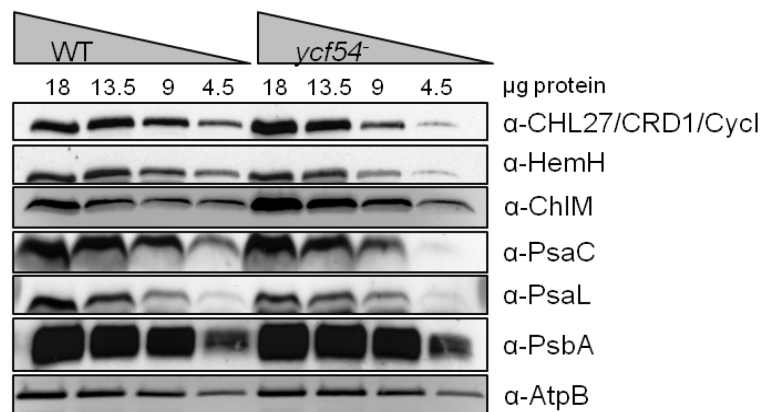
**Tabelle 22:** Tetrapyrrolintermediatgehalte von *Synechocystis* Wildtyp-(WT-) und *ycf54*-Flüssigkulturen in BG11-Medium unter Schwachlichtbedingungen. Die Zellsedimente wurden von Dr. Thomas Wallner (AG Prof. Dr. A. Wilde, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

	WT	<i>ycf54</i>
ProtoIX [pmol mg <sup>-1</sup> Protein]	9,2 ± 0,9	9,0 ± 0,1
MgProto [pmol mg <sup>-1</sup> Protein]	0,21 ± 0,03	0,54 ± 0,19
MgProtoME [pmol mg <sup>-1</sup> Protein]	4,2 ± 1,3	249,9 ± 90,8
Protochlid [pmol mg <sup>-1</sup> Protein]	13,5 ± 3,0	5,5 ± 1,4

### 3.3.3 Einfluss der *ycf54*-Mutation auf die Tetrapyrrolbiosynthese

In den vorhergehenden Abschnitten konnte aufgezeigt werden, dass sich ein Ycf54-Defizit negativ auf die Akkumulation von Protochlid und Chlorophyll auswirkt. Dieser Einfluss wirft die Frage auf, inwiefern die partielle Inaktivierung von *ycf54* eine generelle Veränderung des Fließgleichgewichts der Metabolite des gesamten Stoffwechselweges veranlasst. Schließlich bedarf es einer kontrollierten Regulation der Synthese der Tetrapyrrol-Moleküle, um eine Akkumulation toxischer Intermediate auf einem möglichst geringen Level zu halten (Tanaka & Tanaka, 2007). Im Zuge dieser Regulation kann das Fehlen eines Enzyms der Tetrapyrrolbiosynthese einen Effekt auf die Synthese, Aktivität und Stabilität weiterer Enzyme dieses Synthesezweiges haben. Darüber hinaus können auch zelluläre Komponenten, die Tetrapyrrole als Cofaktoren nutzen, wie etwa die photosynthetischen Komplexe oder Phycobilisomen, beeinträchtigt sein.

Zur Klärung der Fragestellung wurden einige Proteine, die in der Tetrapyrrolbiosynthese involviert sind, wie die Fe-Chelatase, die MgProto-Methyltransferase und die Cyclase selbst, als auch Proteine des Photosynthesekomplexes im semi-quantitativen Western-Blot-Verfahren durch Dr. Thomas Wallner (AG Prof. Dr. A. Wild, Justus-Liebig-Universität Gießen) analysiert (Wallner (2012), Abbildung 28A). Hierzu wurden Gesamtproteinextrakte von Wildtyp und *ycf54* isoliert und zur besseren Visualisierung in einer Verdünnungsreihe aufgetragen (Abbildung 21). Das AtpB-Signal ( $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase) diente hierbei als Ladekontrolle, um gleiche Mengen aufgetragener Proteine von Wildtyp- und Mutantenextrakt kenntlich zu machen. Die Analyse ergab, dass in *ycf54* die Akkumulation von CycI im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt war. Ebenso war in der Mutante der Gehalt an Fe-Chelatase (HemH) verringert, etwa um die Hälfte. Eine CycI-Destabilisierung scheint die Folge erniedrigter Ycf54-Proteinmengen zu sein. Neben einer mutmaßlichen Rolle von Ycf54 in der Cyclase-Reaktion, sprechen die verringerten Gehalte an Photosystem I-Proteinen (PsaC und PsaL), die mit den detektierten Chlorophyll *a*-Gehalten übereinstimmen (Abbildung 19B), für weitreichendere Einflüsse.

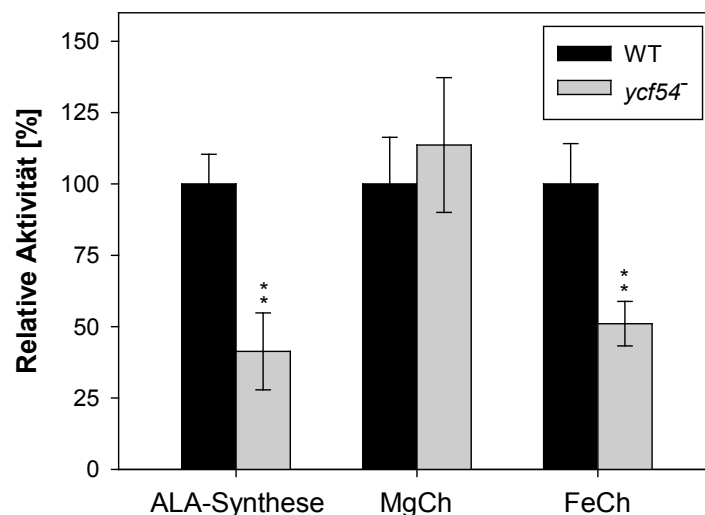


**Abbildung 21:** Semi-quantitative Western-Blot-Analyse von Tetrapyrrolbiosynthese-Enzymen und Photosynthese-Proteinen in *Synechocystis ycf54*-Gesamtzellextrakten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Gleiche Proteinmengen von 18 µg (100 %) und entsprechende Verdünnungen wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Spezifische polyklonale Primärantikörper, die gegen CHL27 aus *Arabidopsis*, MgProto-Methyltransferase (ChlM), Fe-Chelatase (HemH), die PsaC- und PsaL-Untereinheit des Photosystem I und die PsbA-Untereinheit des Photosystem II gerichtet sind, wurden verwendet. Als interne Kontrolle wurde der gegen die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase gerichtete AtpB-Antikörper eingesetzt. Die Detektion erfolgte mithilfe des anti-Kaninchen-HRP-Konjugates als Sekundärantikörper und dem Chemilumineszenz-Assay. Die Analyse und grafische Darstellung wurde im Rahmen der Kooperation von Dr. Thomas Wallner (AG Prof. Dr. A. Wilde, Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführt (Wallner (2012), Abbildung 28A) und dem gemeinsamen Manuskript entnommen (nicht veröffentlicht).

Um die Beeinträchtigung des Tetrapyrrolmetabolismus durch die *ycf54*-Mutation zu untermauern, wurden sowohl Messungen zur ALA-Synthesekapazität als auch zu den

Enzymaktivitäten der Mg- und Fe-Chelatase für Wildtyp- und *ycf54*-Kulturen durchgeführt (Abbildung 22). Die ALA-Syntheserate von *ycf54* war auf lediglich 40 % des Wildtypniveaus herabgesetzt (Abbildung 22). Eine reduzierte Aktivität könnte dahingehend erklärt werden, dass ausgehend von dem Cyclase-Enzymschritt eine metabolische Feedback-Kontrolle auf den ratenlimitierenden Schritt der Tetrapyrrolbiosynthese erfolgt. Basierend auf diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Cyclase zusammen mit Ycf54 auf den Kontrollmechanismus der ALA-Synthese mitzuwirken vermag.

Die Aktivität des Schlüsselenzyms Mg-Chelatase am Verzweigungspunkt der Tetrapyrrolbiosynthese, durch das die Chlorophyllbiosynthese eingeleitet wird, war in *ycf54* nicht signifikant verändert (Abbildung 22). Die Tatsache, dass ProtoIX und MgProto, das Substrat bzw. Produkt der Mg-Chelatase, in der Mutante in ähnlich hohen Mengen wie im Wildtyp akkumulierten (s. Tabelle 22), unterstützt die Beobachtung einer unbeeinflussten Mg-Chelatase-Aktivität. Interessanterweise deuten die Enzym-Aktivitätsmessungen jedoch auf eine Beeinträchtigung der Fe-Chelatase bei Ycf54-Defizienz hin (Abbildung 22), das wiederum mit einer verminderten HemH-Proteinabundanz in *ycf54*-Zellen (s. Abbildung 21) korreliert. Fraglich bleibt allerdings, wodurch genau die Reduktion der Fe-Chelatase-Aktivität bedingt wird. Bislang ist kein Einfluss auf die Reaktion der Fe-Chelatase durch die Cyclase, geschweige denn durch Ycf54, oder eine direkte Interaktion mit dem Enzym nachgewiesen.



**Abbildung 22:** Relative Aktivitäten für Schlüsselenzyme der Tetrapyrrolbiosynthese. In *ycf54*- und Wildtyp-(WT-)zellen wurden unter Schwachlichtbedingungen die ALA-Synthesekapazität und die Aktivitäten der Mg-Chelatase (MgCh) und Fe-Chelatase (FeCh) bestimmt. Die Angabe der Aktivitäten im Diagramm erfolgte relativ zur Aktivität der Enzyme im Wildtyp. Werte für die Aktivität im Wildtyp waren wie folgt: ALA-Synthese  $1,62 \pm 0,17 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ Protein h}^{-1}$ , MgCh  $2,53 \pm 0,41 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ Protein h}^{-1}$ , FeCh  $3,8 \pm 0,54 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ Protein h}^{-1}$ . (\*\*) Sehr signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,01$

### 3.3.4 Ycf54-Überexpression und Komplementation der *ycf54*-Mutation

Im Weiteren galt es, eine potenzielle Komplementation des *ycf54*-Phänotyps zu testen und pleiotrope Effekte der Mutation auszuschließen. Hierzu wurden entsprechende Mutanten herangezogen, die ein 3xFLAG-getaggtetes Ycf54-Protein im Mutanten- oder Wildtyp-Hintergrund unter der Kontrolle des Kupfermangel-induzierbaren *petJ*-Promotors exprimieren (Wallner, 2012) und freundlicherweise von Dr. Thomas Wallner zur Verfügung gestellt wurden. Bereits in früheren Arbeiten kam ein *petJ*-Promotor-Konstrukt zur Expression eines FLAG-Fusionsproteins erfolgreich zum Einsatz, wodurch auch bestätigt werden konnte, dass Kupfermangel nicht zusätzlich die Chlorophyllbiosynthese beeinträchtigt (Sobotka *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009).

Erste Analysen von Proteinextrakten von *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen bestätigten die Abwesenheit des FLAG-getaggteten Ycf54-Proteins, sofern 2,5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> im Wachstumsmedium enthalten war. Wurden hingegen die Zellen in Abwesenheit von 2,5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> kultiviert, so akkumuliert das FLAG-Ycf54-Protein in der unlöslichen Proteinfraction (Wallner, 2012). Darüber hinaus zeigten PCR-Analysen, dass das Einbringen des FLAG-*ycf54*-Konstruktes interessanterweise keine vollständige Segregation der genomischen *ycf54*-Kopien in *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen unter Kupferlimitation bewirkte (Wallner, 2012). Inwiefern die Expression des FLAG-getaggteten Ycf54-Proteins den *ycf54*-Knock-down komplementiert, sollten nachfolgende physiologische Messungen zeigen. Im Rahmen der Kooperation mit Dr. Thomas Wallner (AG Prof. Dr. A. Wilde, Justus-Liebig-Universität Gießen) wurden die Messungen durchgeführt, die zur Erzeugung der Daten in Tabelle 23 beigetragen haben.

Sofern *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen unter Zugabe von 2,5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> im Wachstumsmedium angezogen wurden und entsprechend die Expression von FLAG-Ycf54 unterbunden wurde, waren sehr hohe Gehalte des Cyclase-Substrats MgProtoME detektierbar (Tabelle 23). Im Vergleich zum Wildtyp, der unter den gleichen Bedingungen angezogen wurde, akkumulierten *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen etwa 25-fach mehr MgProtoME. Hingegen wiesen Wildtypzellen, die mit demselben *FLAG-ycf54*-Konstrukt transformiert wurden unter gleichen Anzuchsbedingungen keine veränderten *steady-state*-Gehalte an ProtoIX und Mg-Porphyrinen auf. Wenn allerdings *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen für 7 Tage unter Kupfermangel kultiviert wurden, so verminderte sich der Gehalt an MgProtoME drastisch bis unter Wildtyp-

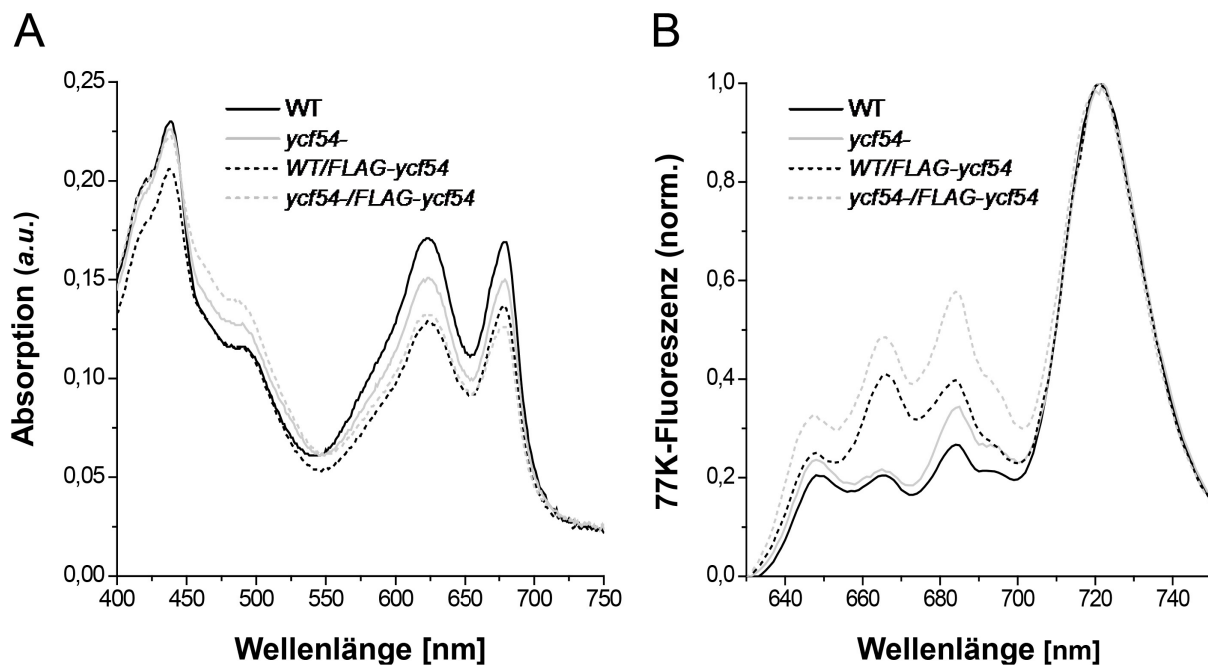
Niveau. Im Unterschied dazu reicherte nach wie vor die *ycf54*-Mutante auch in Abwesenheit von  $\text{CuSO}_4$  im Medium große Mengen des Cyclase-Substrats an.

**Tabelle 23:** Pigment- und Porphyringehalte von *Synechocystis* Wildtyp-(WT)-, *ycf54*<sup>-</sup>, *ycf54/FLAG-ycf54*- und *WT/FLAG-ycf54*-Zellen unter Schwachlichtbedingungen (20  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Ab- oder Anwesenheit von Kupfer im Wachstumsmedium. Die Pigmentquantifizierungen sowie die Bereitstellung der Zellsedimente für die Porphyrinbestimmungen erfolgten in Kooperation durch Dr. Thomas Wallner (AG Prof. Dr. A. Wilde, Justus-Liebig-Universität Gießen).

	$\text{CuSO}_4$ [ $\mu\text{M}$ ]	WT	<i>ycf54</i> <sup>-</sup>	<i>ycf54/FLAG-ycf54</i>	<i>WT/FLAG-ycf54</i>
[ $\mu\text{g mg}^{-1}$ Protein]					
Chlorophyll	0	$28,5 \pm 2,8$	$21,6 \pm 3,4$	$16,6 \pm 5,8$	$20,8 \pm 1,0$
Phycocyanin	0	$262,7 \pm 42,1$	$201,4 \pm 30,5$	$215,4 \pm 65,5$	$189,4 \pm 9,5$
Allophycocyanin	0	$80,3 \pm 16,3$	$62,5 \pm 13,4$	$72,7 \pm 27,4$	$54,5 \pm 2,7$
[ $\text{pmol mg}^{-1}$ Protein]					
ProtoIX	0	$10,9 \pm 3,4$	$21,6 \pm 5,4$	$43,3 \pm 3,3$	$10,4 \pm 0,5$
MgProto	0	$0,5 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
MgProtoME	0	$12,6 \pm 9,4$	$551,4 \pm 160,6$	$9,8 \pm 3,5$	$5,1 \pm 0,8$
[ $\mu\text{g mg}^{-1}$ Protein]					
Chlorophyll	2,5	$27,5 \pm 2,8$	$22,0 \pm 1,5$	$10,4 \pm 3,1$	$23,2 \pm 1,16$
Phycocyanin	2,5	$258,3 \pm 13,5$	$227,1 \pm 19,0$	$141,9 \pm 85,0$	$225,9 \pm 10,6$
Allophycocyanin	2,5	$70,0 \pm 6,5$	$66,0 \pm 20,0$	$46,8 \pm 26,3$	$63,0 \pm 4,7$
[ $\text{pmol mg}^{-1}$ Protein]					
ProtoIX	2,5	$2,6 \pm 0,2$	$9,0 \pm 3,3$	$50,7 \pm 5,4$	$4,3 \pm 1,1$
MgProto	2,5	$0,4 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,1$
MgProtoME	2,5	$9,9 \pm 5,9$	$477,5 \pm 183,6$	$248,0 \pm 101,8$	$10,4 \pm 2,2$

Die induzierte Expression von *FLAG-ycf54* im Wildtyp-Hintergrund resultierte im Vergleich zum Kontrollstamm in äquivalenten bzw. leicht verringerten MgProtoME-Gehalten. Demzufolge scheint eine durch Kupfermangel induzierte Expression von *FLAG-Ycf54* einer MgProtoME-Anreicherung von *ycf54*<sup>-</sup>-Zellen durch Komplementation der Cyclase-Reaktion entgegenwirken zu können. Eine *FLAG-Ycf54*-Überexpression hat folglich keinen negativen Effekt auf die Cyclase-Reaktion. Bei weiterer Betrachtung fallen allerdings die deutlichen Reduktionen der Photosynthesepigmente von *ycf54/FLAG-ycf54*- und *WT/FLAG-ycf54*-Zellen in An- oder Abwesenheit von  $\text{CuSO}_4$  im Wachstumsmedium auf. Die induzierte Expression des *FLAG-Ycf54*-Proteins durch Kupfermangel führte in *WT/FLAG-ycf54*-Zellen sogar zu einer ausgeprägteren Verringerung der Gehalte an Chlorophyll und Phycocyanin bzw. Allophycocyanin.

Absorptionsspektren von ganzen Zellen des Wildtyps und der Mutanten, die unter Abwesenheit von  $\text{CuSO}_4$  im Wachstumsmedium angezogen wurden, bekräftigen die Beobachtung einer unvollständigen Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps nach induzierter FLAG-Ycf54-Expression (Abbildung 23A; Wallner (2012), Abbildung 30B). Demnach wiesen *ycf54*/FLAG-*ycf54*- und *WT*/FLAG-*ycf54*-Zellen deutlich erniedrigte Absorptionsmaxima für Phycocyanin und Chlorophyll *a* gegenüber des originalen *ycf54*- und Kontrollstamms auf. Entsprechend scheint die zusätzliche Expression von FLAG-Ycf54 zwar eine durch den *ycf54*-Knock-down bedingte Akkumulation des Cyclase-Substrats komplementieren zu können, gleichwohl sie im Wildtyp-Hintergrund interessanterweise einen nachteiligen Effekt auf die Pigmentgehalte hat (Tabelle 23, Abbildung 23A).



**Abbildung 23:** Absorptions- und 77K-Chlorophyllfluoreszenz-Emissionsspektren. (A) Absorptionsspektren von Zellkulturen von Wildtyp (WT), *ycf54*-, *ycf54*/FLAG-*ycf54* und *WT*/FLAG-*ycf54*. Die Zellen wurden 7 Tage photoautotroph in BG11-Medium in Abwesenheit von  $2,5 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  unter Schwachlichtbedingungen ( $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kultiviert und zur Aufnahme der Spektren auf eine  $\text{OD}_{750\text{nm}} = 0,4$  verdünnt. Die Peaks bei 625 nm und 685 nm repräsentieren die Absorptionsmaxima von Phycocyanin und Chlorophyll *a*. Die Spektren wurden mit einem UV-2401PC Spektrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) mit integrierender Sphäre (Ulbricht, 1920) im Rahmen der Kooperation von Dr. Thomas Wallner (AG Prof. Dr. A. Wilde, Justus-Liebig-Universität Gießen) aufgezeichnet. (B) 77K-Chlorophyllfluoreszenz-Emissionsspektren von Zellkulturen von WT, *ycf54*-, *ycf54*/FLAG-*ycf54* und *WT*/FLAG-*ycf54*. Die Anregungswellenlänge betrug 440 nm. Die Spektren wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Heiko Lokstein (Universität Glasgow) in der AG Pflanzenphysiologie (Berlin) generiert und auf den Emissionspeak des Photosystems I bei 725 nm normalisiert.

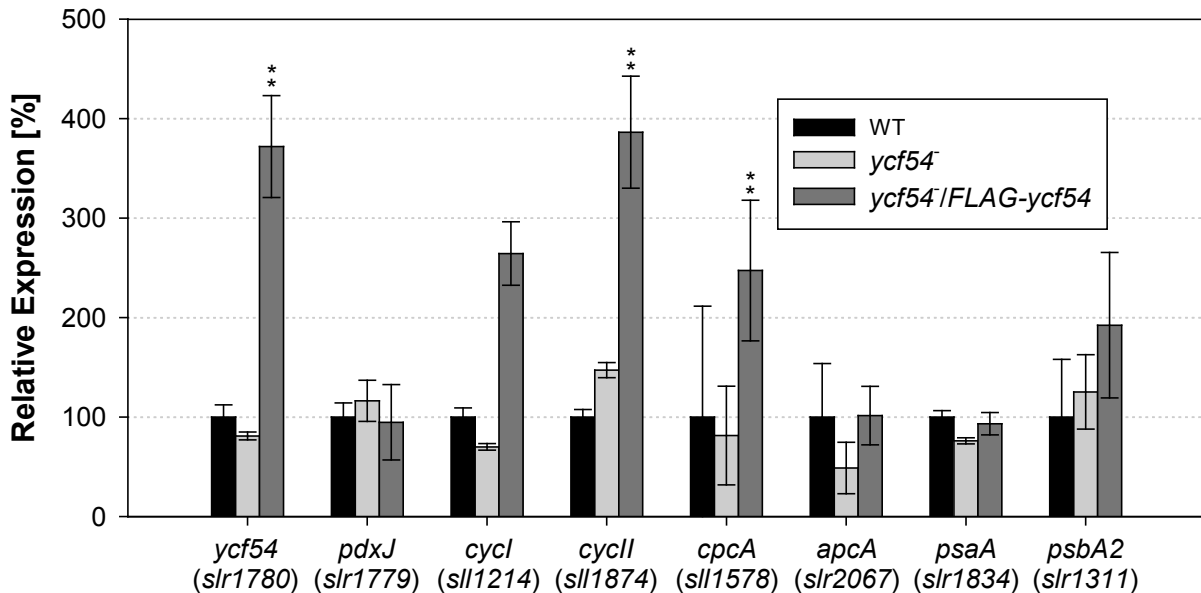
Die Aufnahme von 77 K-Fluoreszenzspektren von Wildtyp-, *ycf54*-, *ycf54*/FLAG-*ycf54*- und *WT*/FLAG-*ycf54*-Kulturen sollte infolgedessen mögliche Veränderungen im Aufbau des Photosyntheseapparates aufdecken (Abbildung 23B). Bei der gewählten Wellenlänge von



440 nm wird vorrangig Chlorophyll *a* in den Reaktionszentren der Photosysteme angeregt. Um einen direkten Vergleich zu erleichtern, wurden die Spektren auf den Peak des Photosystems I bei etwa 725 nm normalisiert. Der relative Anstieg der Fluoreszenzemission des Photosystems II bei 685 nm und 695 nm von *ycf54* im Vergleich zum Wildtyp zeigt auf, dass in der Mutante durch eine limitierte Chlorophyllbereitstellung deutlich stärker das Photosystem I beeinträchtigt ist. Hierzu korrespondierend wiesen *ycf54*-Zellen verringerte Gehalte an PSI-Proteinen auf (Abbildung 21). Beachtenswert ist die erhöhte Emission der Phycobilisomen in den FLAG-Ycf54-überexprimierenden Stämmen *ycf54/FLAG-ycf54* und *WT/FLAG-ycf54*. Da die Absorptionsspektren beider Mutanten keinen Hinweis auf erhöhte Phycobilisomgehalte liefern (Abbildung 23A), könnte die erhöhte Phycobilisom-Emission der FLAG-Ycf54-Überexprimierer auf eine weniger effektive Weiterleitung der Anregungsenergie von den Phycobilisomen auf die Photosysteme herrühren.

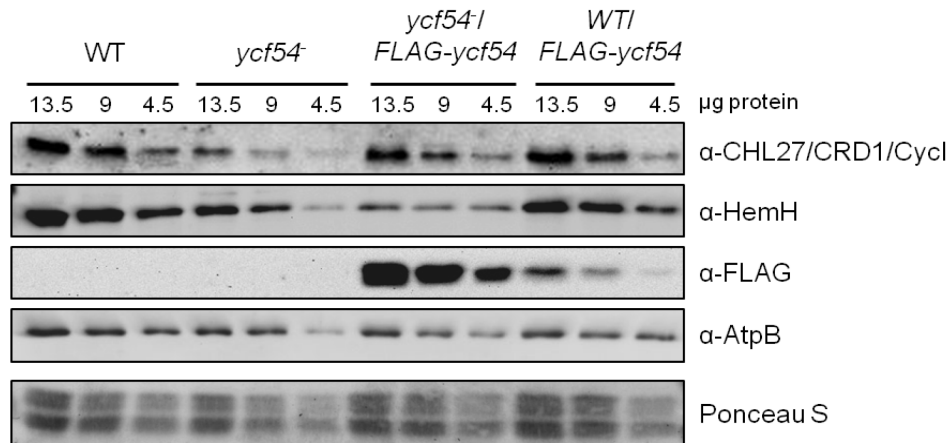
Zum besseren Verständnis der molekularen Ursachen der verringerten Pigmentgehalte nach induzierter FLAG-Ycf54-Expression, wurden Transkriptgehalte der an der Cyclase-Reaktion und der photosynthetischen Lichtreaktion beteiligten Gene von *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen im Vergleich zum originalen *ycf54*- und Wildtyp-Stamm untersucht (Abbildung 24). Während die *ycf54*-Knock-down-Mutante vornehmlich verminderte Transkriptgehalte der ausgewählten Gene im Vergleich zum Wildtyp aufwies, die mit den detektierten Proteingehalten korrelieren (Abbildung 21), waren die Expressionslevel der *ycf54/FLAG-ycf54*-Mutante relativ zum Wildtyp unverändert oder deutlich erhöht. Auch aus diesem Experiment geht die Wichtigkeit einer ausgewogenen Expression von *ycf54* und *cycI* hervor, da in *ycf54*-Zellen bereits die geringfügige Verringerung der Transkripte auf 80 % bzw. 70 % des Wildtyp-Niveaus den starken Phänotyp bedingt. Interessanterweise wurde in *ycf54* das *cycII*-Gen, welches für die zweite Ycf59- Isoform kodiert, im Vergleich zum Wildtyp um 50 % stärker exprimiert. Bisher konnte dem *cycII*-Gen nur eine Funktion unter sauerstofflimitierenden Wachstumsbedingungen zugeschrieben werden (Minamizaki *et al.*, 2008; Peter *et al.*, 2009). Den Erwartungen entsprechend kam es in den FLAG-*ycf54* exprimierenden Zellen zu einer signifikanten Transkriptakkumulation von *ycf54*. Zugleich wurde auch die Expression von *cycI* und *cycII* deutlich in *ycf54/FLAG-ycf54* hochreguliert. Die ausgewählten, repräsentativen Gene, die Proteine der Photosysteme (Untereinheit Ia des P700-Apoproteins und D1-Protein des Photosystems II) und Phycobilisomen ( $\alpha$ -Untereinheit des Phycocyanins und Allophycocyanins) kodieren, wiesen tendenziell wildtypähnliche oder erhöhte Expressionen auf. Im Weiteren konnten die qPCR-Analysen einen möglichen

pleiotropen Effekt der Insertionsmutagenese durch eine potenzielle Dysregulation des im gleichen Operon stromaufwärts von *ycf54* gelegen *pdxJ*-Gens ausschließen. Eine Veränderung der Expression durch den Knock-down oder durch die Ycf54-Überexpression wurde nicht hervorgerufen.



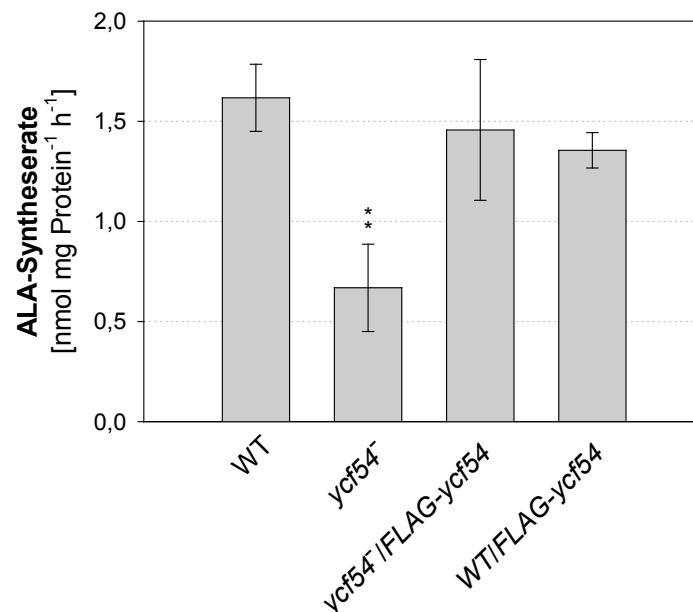
**Abbildung 24:** qPCR-Analysen zur Quantifizierung von Transkriptgehalten ausgewählter Gene, die an der Cyclase-Reaktion und der photosynthetischen Lichtreaktion beteiligt sind, von *Synechocystis* Wildtyp-(WT)-, *ycf54*<sup>-</sup>- und *ycf54*/FLAG-*ycf54*-Zellen. Die Kulturen wurden unter kupferlimitierenden Schwachlichtbedingungen ( $15 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen. Als internes Referenzgen diente *trpA* (*slr0966*). Die Primersequenzen sind in der Tabelle 30 aufgeführt. (\*\*) Sehr signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,01$

Der Einfluss von Ycf54 auf die CycI-Stabilisierung in den Komplementanten bzw. überexprimierenden Zellen wurde im Folgenden durch ergänzende Western-Blot-Analysen untersucht (Abbildung 25). Dabei stellte sich heraus, dass nach induzierter Bildung des FLAG-Ycf54-Proteins erhöhte Proteingehalte des CycI-Proteins im Vergleich zur Knock-down-Mutante detektiert werden konnten. Die Transkriptakkumulationen für *cycI* in den FLAG-Ycf54-exprimierenden Stämmen (Abbildung 24) spiegeln sich jedoch nicht in einer zum Wildtyp verstärkten CycI-Proteinabundanz wider. Die HemH-Proteingehalte, die deutlich in *ycf54*/FLAG-*ycf54*- und leicht in *WT*/FLAG-*ycf54*-Zellen verringert waren, könnten die verminderte Anreicherung der Phycobiline erklären (Tabelle 23) und auf eine unvollständige Komplementierung der in *ycf54*<sup>-</sup> reduzierten Fe-Chelatase-Aktivität (Abbildung 22) hinweisen.



**Abbildung 25:** Semiquantitative Western-Blot-Analysen von *Synechocystis* Wildtyp-(WT-), *ycf54*<sup>-</sup>, *ycf54*<sup>-</sup>/FLAG-*ycf54*- und WT/FLAG-*ycf54*-Gesamtzellextrakten. Gleiche Proteinmengen von 13,5 μg (100 %) und entsprechende Verdünnungen wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Spezifische polyklonale Primärantikörper, die gegen CHL27 aus *Arabidopsis* und Fe-Chelatase (HemH), gerichtet sind, sowie der monoklonale Antikörper, der gegen den FLAG-tag gerichtet ist, wurden verwendet. Als interne Kontrolle wurde der gegen die β-Untereinheit der ATP-Synthase gerichtete AtpB-Antikörper eingesetzt. Gleiche Beladung wurde zudem durch Ponceau S-Färbung visualisiert. Die Detektion erfolgte mithilfe des anti-Kaninchen-HRP-Konjugates als Sekundärantikörper und dem Chemilumineszenz-Assay.

Zur Vervollständigung der Daten wurden auch Messungen der ALA-Synthesekapazitäten von *ycf54*<sup>-</sup>/FLAG-*ycf54*- und WT/FLAG-*ycf54*-Zellen durchgeführt. Nach induzierter Expression von FLAG-Ycf54 kann demnach interessanterweise nicht nur die durch Ycf54-Defizienz bedingte Anreicherung von MgProtoME kompensiert werden (Tabelle 23), sondern auch die Bildung von ALA annähernd auf Wildtypniveau angehoben werden. Demzufolge sollte im Grunde eine normale oder ggfs. höchstens leicht reduzierte Synthese von Tetrapyrrolen gewährleistet sein. Die Pigmentreduktionen stehen aber zu der zusätzlichen FLAG-Ycf54-Expression im Widerspruch. Zweifelsohne lässt sich basierend auf diesen Ergebnissen behaupten, dass die Cyclase-Reaktion zusammen mit Ycf54 einen Kontrollmechanismus der ALA-Synthese realisiert.



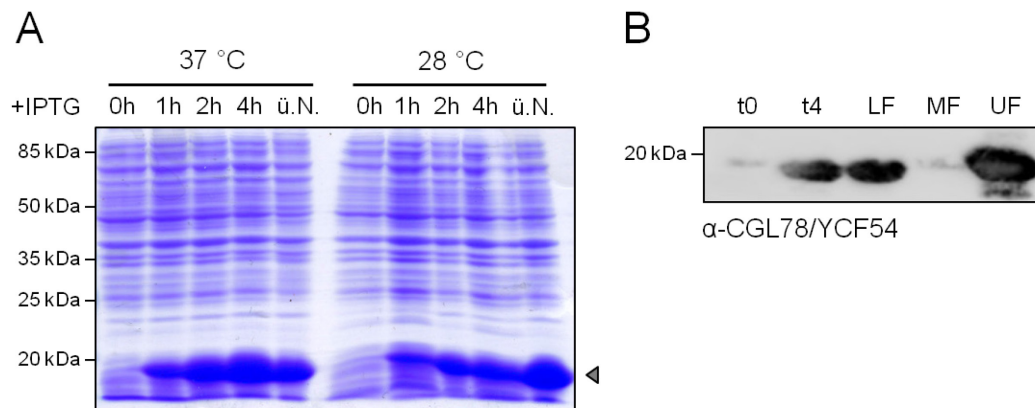
**Abbildung 26:** Synthese von 5-Aminolävulinsäure in Wildtyp-(WT-), *ycf54*<sup>-</sup>, *ycf54/FLAG-ycf54*- und *WT/FLAG-ycf54*-Zellen. Die Kulturen wurden zur Bestimmung der ALA-Syntheserate unter Schwachlichtbedingungen (15  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Kupfermangel angezogen. (\*\*) Sehr signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,01$

### 3.3.5 Identifizierung potenzieller Interaktionspartner von Ycf54 in *Synechocystis*

Die Identifizierung potenzieller Interaktionspartner von Ycf54 sollte ein vielversprechender Ansatz sein, um Näheres zur Funktionsweise des Proteins zu erfahren und dessen Beteiligung an der Cyclase-Reaktion nachzuweisen. Hierbei diente der an Ycf54 fusionierte 3xFLAG-tag, ein stark immunogenes Tandem-Peptid, als Epitop, das sich bereits in anderen Arbeiten bewährt hatte (Dürring *et al.*, 2006; Sobotka *et al.*, 2008). Unter Zuhilfenahme der FLAG-M2-Affinitätsmatrix konnte in solubilisierten Proteinextrakten von *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen nach Immunpräzipitation erfolgreich die Cyclase-Untereinheit CycI mittels Western-Blot-Verfahren in den Eluaten identifiziert werden (Wallner, 2012). Der Fe-Chelatase/HemH-Antikörper gab keinen Hinweis auf eine spezifische Immunreaktion in den Protein-Eluaten von *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen.

Versuchsweise wurden die affinitätsgereinigten Protein-Eluate aus *ycf54/FLAG-ycf54*-Zellen für eine massenspektrometrische Analyse durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sacha Baginsky (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Pflanzenbiochemie) vorbereitet. Hierzu wurden die eluierten Proteinkomplexe einer Minimalaufreinigung mittels SDS-PAGE unterzogen (kurzes Einlaufen in das Trenngel), mit Coomassie fixiert, entfärbt, reduziert, alkyliert und mit Trypsin zu einzelnen Peptiden verdaut, die mittels LC/MS-MS analysiert wurden. Da diese erste Analyse

keine eindeutigen Hinweise auf weitere potenzielle Interaktionspartner lieferte wurde als Alternative ein 6x-His-Pulldown durchgeführt. Zur Expression des rekombinanten 6x-His-Ycf54-Fusionsproteins in *E. coli* wurde die kodierende Sequenz von *Synechocystis ycf54* mit den Primern slr1780\_oATG\_BamHI\_fw und slr1780\_+Stop\_SalI\_rev amplifiziert, in den *pJET1.2/blunt cloning vector* (Fermentas) zwischenkloniert und final in den pET28a-Expressionsvektor (Merck) ligiert.



**Abbildung 27:** Expression und Aufreinigung des rekombinant in *E. coli* exprimierten 6xHis-Ycf54-Proteins zur Durchführung von Pulldown-Experimenten. (A) Das mit Hexahistidin N-terminal getaggte Ycf54-Protein wurde sowohl bei 37 °C als auch bei 28 °C im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) exprimiert. Die Induktion der Expression mit 0,5 mM IPTG wurde 0 h, 1 h, 2 h, 4 h sowie nach einer Inkubation über Nacht (ü.N.) verfolgt und nach SDS-PAGE per Coomassie-Färbung dokumentiert. Der graue Pfeil kennzeichnet die vorausberechnete molekulare Größe des 6xHis-Ycf54-Fusionsproteins (15,2 kDa). (B) Die Western-Blot-Analyse zur Untersuchung der Löslichkeit des rekombinant in *E. coli* exprimierten 6xHis-Ycf54 bei 37 °C belegte einen Anteil des Proteins in der löslichen Fraktion (LF), kaum einen Anteil in der membranassoziierten Fraktion (MF) und einen Hauptanteil in der unlöslichen Fraktion (UF). Zusätzlich wurde die IPTG-induzierte Expression nach 4-stündiger Inkubation (t4) im Vergleich vor der Inkubation (t0) überprüft. Der immunologische Nachweis erfolgte unter Verwendung des Primärantikörpers anti-CGL78/YCF54.

Über den N-terminalen 6x-His-tag wurde das erfolgreich exprimierte Protein (Abbildung 27) unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und im 6x-His-Pulldown mit *Synechocystis*-Extrakt eingesetzt. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass sich ein C-terminal His-getaggt Ycf54-Fusionsprotein nicht in *E. coli* exprimieren ließ (Daten nicht gezeigt).

In Zusammenarbeit mit Dr. Sascha Rexroth und Nicole Plohnke (Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen; Medizinisches Proteom-Center; Ruhr-Universität Bochum) wurden die Eluate von insgesamt drei unabhängigen *in vitro*-Bindungsstudien massenspektrometrisch analysiert. Auffallend viele Proteine, darunter auch die Cyclase-Untereinheit CycI, traten in den Negativkontrollen auf, für die die ungebundene Ni-NTA-Agarose ohne bait-Protein eingesetzt wurde, und folglich als unspezifisch deklariert werden. Alle gemeinsam in den tryptisch

verdauten Eluaten der Pulldown-Experimente identifizierten Proteine, die keine Übereinstimmung mit den Negativkontrollen zeigten, sind in der Tabelle 24 gelistet.

**Tabelle 24:** Identifizierte Proteine in Eluaten von 6xHis-Ycf54-Pulldown-Experimenten mittels LC-MS/MS und Datenbanksuche. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Pulldown-Assays sind aufgeführt. (PSM) engl. für Peptid-Spektrum-Übereinstimmung

Protein	UniProt ID	Score	Abdeckung [%]	Anzahl Peptide	PSM
Protein unbekannter Funktion slr6013	Q6YRT2	67,6/15,8/40,2	25,9/10,3/22,5	9/4/8	27/5/16
ATP-Bindeprotein vom ABC-Transporter slr2019	P73239	49,9/40,4/93,0	1,2/1,2/1,2	1/1/1	44/32/65
Sensor-Histidinkinase Hik36 slr0073	Q55788	32,3/34,4/20,7	4,4/4,4/4,4	1/1/1	22/17/16
Alanyl-tRNA-Synthetase (AlaS) sll0362	P74423	0,0/0,0/0,0	1,03/1,03/1,03	1/1/1	23/4/28
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Antiporter (NhaS2) sll0273	P74393	2,0/4,3/0,0	4,63/4,63/4,63	1/1/1	18/11/7
Protein unbekannter Funktion sll5083	Q6ZEP7	4,6/2,0/0,0	2, 6/2,6/2,6	1/1/1	10/2/4
Hypothetisches Protein ssl0242	P74470	8,7/6,2/11,3	30,8/14,1/30,8	2/1/2	5/3/7
Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (PurU) sll0070	Q55135	12,1/4,6/2,3	9,9/5,6/3,2	3/2/1	5/3/1

Neben Proteinen, die eine Rolle in der Translation, Signaltransduktion und Purinbiosynthese spielen oder als Transporter-Protein fungieren, konnten zwei Proteine unbekannter Funktion und ein hypothetisches Protein identifiziert werden. Orthologe von Sll5083 haben eine ATPase-Funktion (ABC-Transporter N). Bislang kann jedoch kein funktioneller Zusammenhang zwischen Ycf54 und Transporter-Proteinen postuliert werden. Die Preprotein-Translokase-Untereinheit SecE oder der Phycobilisom-*core*-Membran-Linker (Phycobiliprotein ApcE) sind orthologe Proteine von Slr6013. Zunächst gelte es, die Funktion von Slr6013 als Phycobiliprotein nachzuweisen sowie die Spezifität einer putativen Interaktion von Ycf54 und Slr6013 zu verifizieren. Weitere Studien könnten dahingehend eine Verbindung zwischen dem Angebot an Ycf54 und der Stabilität und/oder Assemblierung pigmentbindender Proteine aufzeigen.

### 3.4 Untersuchungen zur Funktion von Ycf54-Homologen in höheren Pflanzen

Die Ergebnisse der Experimente mit der cyanobakteriellen *ycf54*-Mutante konnten bereits deutlich zeigen, welche wesentliche Rolle Ycf54 im Chlorophyllstoffwechsel in *Synechocystis* spielt. Das Ycf54-Protein scheint für eine vollständige Cyclase-Reaktion unverzichtbar zu sein. Ob für das pflanzliche Homolog eine ähnliche Funktion postuliert werden kann, war bis dato ungewiss. Die folgenden Experimente sollten dazu dienen, die physiologische Rolle des Ycf54-Homologs innerhalb der Tetrapyrrolbiosynthese und Photosynthese höherer Pflanzen besser zu verstehen.

Wolfgang Lein und Mitarbeiter nutzten eine normalisierte cDNA-Bibliothek aus Tabakblättern zur Generierung einer großen Kollektion von Antisense-Tabak-Transformanten (Lein *et al.*, 2008). Diese Mutanten wurden auf starke Defekte in der Blattpigmentierung und im autotrophen Wachstum hin untersucht. Wohlbekannte Kandidaten an Proteinen wurden hierbei entdeckt, die in die Photosynthese und den Primärmetabolismus involviert sind, aber auch neun Proteine unbekannter Funktion, denen eine wichtige Rolle beim Pflanzenwachstum und Zellerhalt zugesprochen wird. Bereits eines der unbekannten Proteine, Ycf3-interagierendes Protein 1, konnte in einer Arbeit als ein neuer für die PSI-Biogenese erforderlicher Assemblierungsfaktor charakterisiert werden (Albus *et al.*, 2010). Beginnende und in dieser Arbeit weiterführende Experimente dienten der Untersuchung eines weiteren Proteins unbekannter Funktion, das anhand des Screens identifiziert wurde. Die Antisense-Wirkung des korrespondierenden Gens resultierte in einer starken Reduzierung der Blattpigmentierung, infolgedessen die Bezeichnung *Low Chlorophyll Accumulation A* (*LCAA*) für die Antisense-Pflanzen verwendet wurde.

#### 3.4.1 Sequenzanalyse von *LCAA* und subzelluläre Lokalisation des Genproduktes

Für das in den Tabak *LCAA*-Antisense-Pflanzen unterdrückte Gen wurden in der DFCI Tobacco Gene Index Datenbank (<http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tobacco>) drei tentative consensus (TC-)Sequenzen gefunden, TC41423, TC46832 und TC70459. Die abgeleiteten, kodierenden Proteinsequenzen der jeweiligen TC-Sequenzen mit einer Gesamtlänge von 222 bzw. 214 Aminosäuren unterscheiden sich nur marginal in wenigen Positionen (s. Alignments im Anhang, Abbildung 44). In anderen Organismen wurden homologe Sequenzen mithilfe der nicht-redundanten Proteindatenbank von NCBI unter Verwendung des BLAST P Algorithmus (Altschul *et al.*,

1990) identifiziert. In der Abbildung 28 ist das Alignment von den *LCAA*-Genprodukten aus *Arabidopsis* und Tabak mit Homologen von ausgewählten Vertretern der Monokotylen (*Oryza sativa*, *Zea mays*), Gymnospermen (*Picea sitchensis*), Moose (*Physcomitrella patens*), Grünalgen (*Chlamydomonas reinhardtii*), Rotalgen (*Porphyra purpurea*) und Braunalgen (*Fucus vesiculosus*) sowie Cyanobakterien (*Synechocystis* sp. PCC6803) gezeigt. Alle Homologen weisen als Gemeinsamkeit eine augenscheinliche Konservierung des Sequenzkernbereichs auf, die Ycf54-Domäne (*InterProScan* 4; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>; Mulder & Apweiler (2008), Hunter *et al.* (2009)), die bereits aus dem Abschnitt 3.2 bekannt ist.

Die Tatsache, dass das *LCAA*-Gen in einigen Organismen im Laufe der Evolution im Plastom verblieb, deutet auf eine Funktion des Genproduktes im Chloroplasten hin. *In silico*-Analysen mithilfe von *iPSORT* (<http://ipsort.hgc.jp/>; Bannai *et al.* (2002)) und *TargetP* v1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>; Emanuelsson *et al.* (2007)) untermauern diese Vermutung, indem die Lokalisierung des *LCAA*-Proteins für höhere Pflanzen im Chloroplasten prognostiziert wird. Die *Plant Proteomics* Datenbank (PPDB, <http://ppdb.tc.cornell.edu/>; Cornell Universität; Sun *et al.* (2009)) identifizierte *LCAA* als Chloroplasten-lokalisiertes Protein, dessen Assoziation an die Thylakoidmembran vermutet wird. Zur Verifizierung dieser Annahmen wurde in vorhergehenden Experimenten die subzelluläre Lokalisation von *LCAA* anhand von GFP-Fusionskonstrukten überprüft.

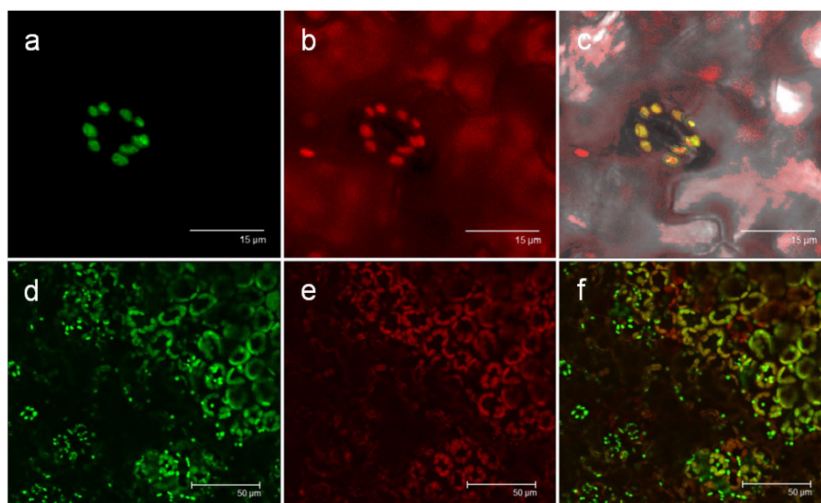


Arabidopsis	MWSVTGALTVAVPPTAAA-----CRTKPFLISSSFQKQ--TKKLHLSSPSLSLPSSH	51
Nicotiana	-MSASTALNLGSLCSSVNLPHYSHKPSLLFHGIQSQQF--LASPNTVLKGFNGSSRRR	57
Oryza	-MVAPATLSLRPFATLAP-----SRAALPRVGAGFA-----LPPAVS--CQPRRRRL	44
Zea	-MVTPTATSLRPSAPPAP-----PRAGLPRARACFAPA--IRTSPSAV--FSYQPRRF	48
Picea	-MVVAATATTATLTGHGAIHTSTLLRESTTTRFCIGWASLPFACKNHEKSGALMCSSSKI	59
Physcomitrella	-----	
Chlamydomonas	-MAVSMKMQORTIATASK-----QSIAPVARPVARPFSARRPVAAAVRSSEEVARR	50
Porphyra	-----	
Fucus	-----	
Paulinella	-----	
Synechocystis	-----	
Arabidopsis	SSSFKAATSIEQQSSVNKGE-----STKYHFLVANAK-FMLD-EEHFQEQQLFERLRYF	104
Nicotiana	WELSRKVKRAVAADVSDPAEKQETERKKYFLVANAK-SMLD-EEHFQEQQLFERLRLF	115
Oryza	S--LRAVAVDSDQQGSPEPPD-QEAKPKKYHFLVANAK-FMLD-EEHFQEQQLKEKLRLY	99
Zea	SGIRRAVAVDSEQ-GSPESPE-QEKKPKTYFLVANAK-FMLD-EEHFQEQQLAEKLRLNY	104
Picea	RASSTPIKAVAKEAQLASTEIDQKRRTKYHYLVANAK-FMLD-EEHFNLMCELRRLNY	117
Physcomitrella	-----QKTTYYYLIANAK-FMLD-DEEHFQEQMSEKLRLMY	33
Chlamydomonas	SSVVVRAAAPAPAAASADKAT---AAEYYALVCNAEWFMDPQNESVAEQLEKVRFF	105
Porphyra	-----MTYYFALASQN-FLLS--EPLLEEVFRERINYY	31
Fucus	-----MQKHLTTYFYFIIASTE-FFLR--YEPVEEVFRERTQHY	35
Paulinella	-----MSTYYFVAASER-FFTE--IDRLEEVFQERVYNY	31
Synechocystis	-----MATYYYALASQK-FLLE--EFPFEEVLKERRRDY	31
	*: . . . : . * : * : :	
Arabidopsis	GERELVQDFWLVIPEPKFLD-NFPKITQR-----LRRPAVALVSTNGTWITFMKLRLDR	156
Nicotiana	GERNKEQDFWLVIPEPKFLD-KYPNITKR-----LKRPAVALVSTNGTWITFMKLRLDR	167
Oryza	GEREKEQDFWLVIPEPKFLD-RFPNITKR-----LKRPAVALVSTNGTWITFMKLRLDR	151
Zea	AERDKQDFWLVIPEPKFLD-RFPNITKR-----LKRPAVALVSTNGTWITFMKLRLDR	156
Picea	GERNKEQDFWLVIPEPKFLD-KFPDVTQR-----LRRPAVALVSTNGTWITFMKLRLDR	169
Physcomitrella	GERNKEQDFWVIEPEFLD-KHPEVAKR-----VGRPAAALVSTDRVWITFMKLRLDR	85
Chlamydomonas	KEQNKERDFFIVPNPKWLDKAFPEQAKQ-----VKRPCVALVSTDKMWITFMKLRLDR	158
Porphyra	QSNNKEIDFWLIPNPKFLNPKAMIKFK-----NLVPNEAIAIISTNSIFINWLKLRIGY	85
Fucus	RREKKSTDFWFLSSPDFLESSQLSGIRNKLLDVNLPKEMCSAIVSLDENFIWSKLRFNN	95
Paulinella	TRSGKPIDFWLVKKPVFLNSGNFP-----LIADIVSSPAAAIIVSTDQSFIEMKLRLFE	85
Synechocystis	GEKNKEIDFWQVIQPAFLNAPELAEAK-----AKAPEKNVAIVSTNKSFIWVVKLRLEY	85
	** : . * : * : *: : * : : * : * : *	
Arabidopsis	VLYDSFEATSLDEALASNPTTLEFDKPKNWVAPYPKYEPGWWDFTFLPKVTQESAV	211
Nicotiana	VLQESFEADSTEEALACTPVNLEFEKPEKWTAPYPKYESGWWEFPLPPGSHTSKV	222
Oryza	VLAEQFEAETLEEALASNVDLKFDPKPEKWTAPYPKYEGWWEFPLPPKSSNGTA	206
Zea	VLQDQFDAESVEEALASNVELKFEKPEKWTAPYPKYEGWWEFPLPPKFSNGTA	211
Picea	VLQGEFEAETLEEALSNPVDLNFQKPEKWTAPYAKYEGWWEFPLPPSE---	220
Physcomitrella	VLKGEITDTSPEEALAGLTTVEFERPAKWIAPYPKYEGDWWTFFLYKKD----	135
Chlamydomonas	VLKIDLKSMASEVLAAGEALPDFKPDGKWTAPYARYTPGWWNVFLPNH-----	207
Porphyra	VCIGQFEDSLKLSKESLNIINRT-----	108
Fucus	VIMGSFVAPTDDIPNPLAYSLVSIVL-----	121
Paulinella	VVKGTLESNKQDFSDILAR----IE-----	106
Synechocystis	VLTGEFEAPSDAIPDPLASLD-----	106
	* :	

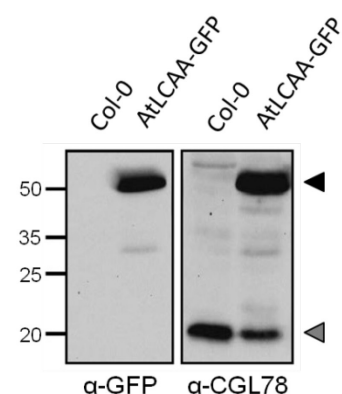
**Abbildung 28:** Sequenzalignment zur Verdeutlichung der evolutiven Konservierung von LCAA in höheren Pflanzen, Moosen, eukaryotischen Algen und Cyanobakterien. Die homologen Proteine aus den Dikotyledonen *Arabidopsis* und Tabak (TC41423), den Monokotyledonen Reis und Mais, dem Gymnosperm *P. sitchensis* sowie der Grünalge *C. reinhardtii* sind kernkodiert und weisen dadurch ein putatives Transitpeptid auf (grau hervorgehoben; ChloroP 1.1, <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>). LCAA-Homologe des Mooses *P. patens*, der Rotalge *P. purpurea* und der Braunalge *F. vesiculosus* sind plastidenkodiert. Zusätzlich ist noch die Sequenz des Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 gezeigt. Das Alignment wurde mit *ClustalW2* erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>); (\*) identische Aminosäuren, (:) konservierte Aminosäuren, (.) semikonservierte Aminosäuren. Die Sequenz der Ycf54-Domäne (DUF2488; *InterProScan* 4, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) ist unterstrichen.

Die transiente Expression der GFP-fusionierten LCAA-Homologe aus *Arabidopsis* und Tabak in Tabak-Protoplasten resultierte in einer Überlappung der GFP- und Chlorophyllfluoreszenz (Albus *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde *Arabidopsis* obendrein mit einem *AtLCAA-GFP*-Fusionskonstrukt stabil transformiert, um unter anderem auch das *AtLCAA*-Targeting in den Chloroplasten nachzuweisen. Hierzu wurde die kodierende Sequenz *AT5G58250* für das LCAA-Homolog aus *Arabidopsis*-cDNA mithilfe der Gateway®-Technologie (Life Technologies, Darmstadt, GER) in den binären Gateway®-Vektor pGWB505 (Nakagawa *et al.*, 2007) kloniert und freundlicherweise von Dr. Olaf Czarnecki (Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, USA) zur Verfügung gestellt. Die Expression erfolgte unter der Kontrolle des starken konstitutiven *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S-Promotors und wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 29B). Die *in-vivo*-Aufnahmen der konfokalen Laserscanningmikroskopie zeigen eine Überlappung der GFP- und Chlorophyll *a*-Autofluoreszenz (Abbildung 29A) und belegen die chloroplastidäre Lokalisation des GFP-getaggten homologen LCAA-Proteins in *Arabidopsis*.

A



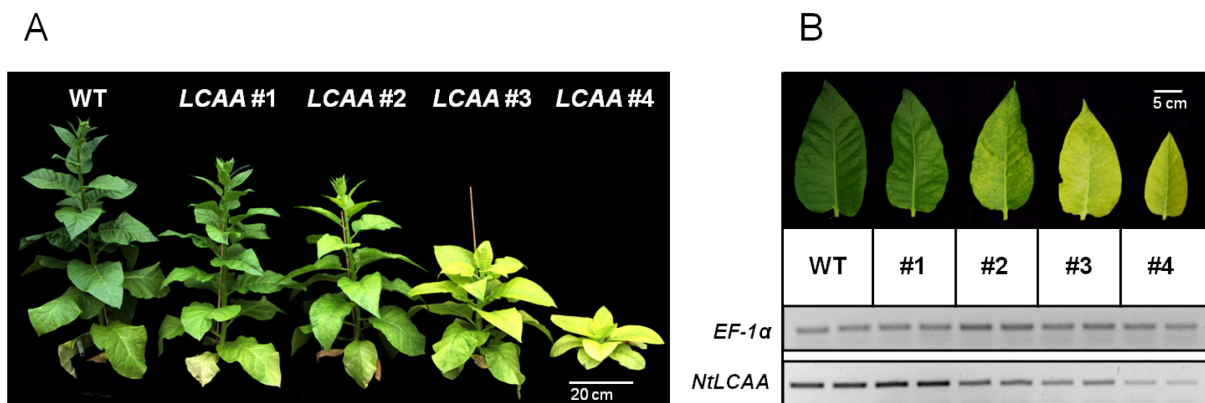
B



**Abbildung 29:** Überexpression und subzelluläre Lokalisation von *AtLCAA-GFP*. (A) *In-vivo*-Detektion von GFP- (a, d; grün) und Chlorophyll *a*-Autofluoreszenz (b, e; rot) sowie beider überlagerter Fluoreszenzen (c, f; gelb) vollentwickelter Blätter der *AtLCAA-GFP*-exprimierenden transgenen Linie mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Die obere Reihe (a-c) zeigt eine Nahaufnahme von Chloroplasten einer Spaltöffnung auf der Blattepidermis. Die untere Reihe (d-f) zeigt Chloroplasten in den Mesophyllzellen. (B) Immunodetektion von *AtLCAA-GFP*. Proteinextrakte gleicher Mengen an Frischgewicht (20 mg) junger Blätter von Wildtyp Col-0 und der transgenen Linie wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die *AtLCAA-GFP*-Fusion wurde unter Verwendung des anti-GFP und anti-CGL78/YCF54-Antikörpers nachgewiesen. Der schwarze und der graue Pfeil kennzeichnen die vorausberechnete molekulare Größe des *AtLCAA-GFP*-Fusionsproteins (51 kDa), bzw. des endogenen *AtLCAA* (24,1 kDa).

### 3.4.2 Phänotypische und physiologische Charakterisierung der Tabak *LCAA*-Antisense-Pflanzen

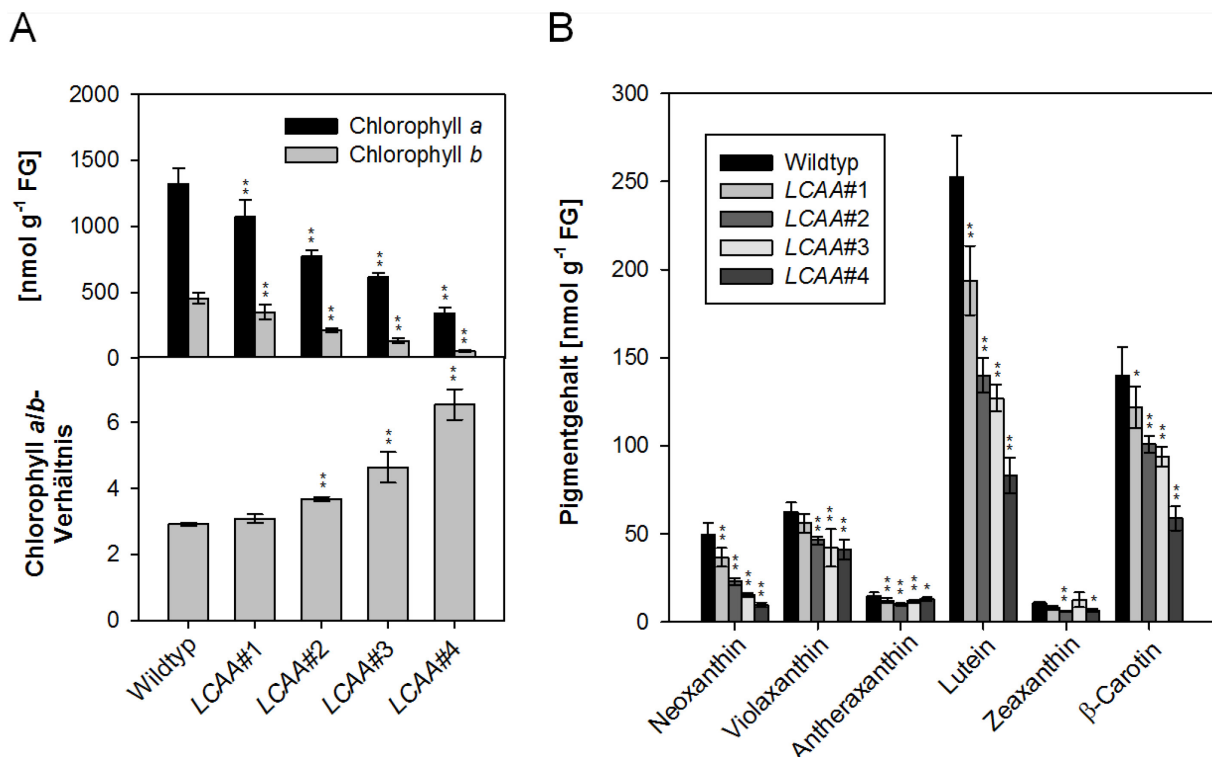
Für weitere Untersuchungen wurden vier unabhängige Linien der Antisense-Tabakpflanzen herangezogen und anhand der zunehmenden Ausprägung ihrer Phänotypen von *LCAA*#1 bis *LCAA*#4 durchnummeriert (Abbildung 30). Die Fotos aus der Abbildung 30 wurden zu dem Zeitpunkt aufgenommen, als der Tabak-Wildtyp SNN begann, Blütenknospen zu bilden. Alle Antisense-Linien zeigten relativ zum Wildtyp ein retardiertes Wachstum und einen zunehmend ausgeprägten Pigmentmangel. Die Abstufungen der Veränderungen des Phänotyps korrelierten erwartungsgemäß mit der zunehmend starken Verringerung des *NtLCAA*-Transkriptgehaltes in den transgenen Linien (Abbildung 30B).



**Abbildung 30:** Repräsentative Tabak *LCAA*-Antisense-Linien. (A) Die Wuchspflanzen und (B, oben) Blattphänotypen von Wildtyp SNN (WT) und *LCAA*#1 bis *LCAA*#4 sind in der Reihenfolge zunehmender Ausprägung dargestellt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen bei 250  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 24 °C angezogen. Das Foto wurde im Stadium der Knospenbildung des WT aufgenommen. (B, unten) Semiquantitative PCR-Analysen von je zwei repräsentativen Pflanzen je Linie verdeutlichen die Korrelation zwischen dem vom Wildtyp abweichenden Phänotyp und der verminderten Expression von *NtLCAA* in den Antisense-Linien.

Die Pigmentquantifizierung belegte die drastische Reduktion des Chlorophyllgehaltes in den Antisense-Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die Linie *LCAA*#4 mit dem auffälligsten chlorotischen Phänotyp enthielt lediglich etwa 25 % des Chlorophyll *a*- und weniger als 15 % des Chlorophyll *b*-Levels des Wildtyps (Abbildung 31A, oben). Erwähnenswert ist, dass die Bildung von Chlorophyll *b* stärker beeinträchtigt war als die von Chlorophyll *a*. Dies spiegelt sich deutlich in der Erhöhung des Chlorophyll *a/b*-Verhältnisses von 2,92 im Wildtyp auf 6,55 in der *LCAA*#4-Linie wider (Abbildung 31A, unten). Unter Berücksichtigung, dass Chlorophyll *b* ausschließlich durch LHC-Proteine gebunden wird, während die Reaktionszentren der Photosysteme nur Chlorophyll *a* binden, weisen die Ergebnisse auf eine

reduzierte LHC-Akkumulation hin. LHCs benötigen für eine korrekte Funktion neben Chlorophyll auch Carotinoide als akzessorische Pigmente, die die Lichtabsorption um den blau-grünen Bereich (350-550 nm) erweitern und maßgeblich zur Photoprotektion beitragen (Siefermann-Harms, 1987; Young, 1991). Entsprechend sind LHCII-Proteine in einem ganz bestimmten Verhältnis mit drei Carotinoiden assoziiert: Neoxanthin, Lutein und Violaxanthin (Liu *et al.*, 2004). Hierzu korrelierend untermauern die Ergebnisse zur Bestimmung der Carotinoidgehalte in den *LCAA*-Antisense-Linien, die für die Xanthophylle Neoxanthin und Lutein die deutlichste Reduktion zeigten (Abbildung 31B), die Annahme beeinträchtigter Pigment-Protein-Komplexe in den Mutanten. Die in den Antisense-Linien zunehmende Verringerung der  $\beta$ -Carotine, die vornehmlich in den Reaktionszentren der Photosysteme gebunden sind, lässt außerdem eine Schädigung der photosynthetischen Kernkomplexe vermuten. Denkbare Reduktionen von LHC-Proteingehalten können aufgrund eines Defekts in der Biogenese bzw. der Membraninsertion der LHC-Apoproteine oder durch einen Defekt in der Chlorophyllbiosynthese erklärt werden.



**Abbildung 31:** Pigmentgehalte von Tabak Wildtyp und den *LCAA*-Antisense-Linien. Die Pflanzen wurden nach der Selektion für zwei Wochen in der Phytokammer unter Langtagbedingungen bei 250  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 25 °C angezogen. In den jeweils drittjüngsten Blättern von mindestens drei Pflanzen je Linie wurden (A, oben) der Gehalt an Chlorophyll *a* und *b*, (A, unten) das Chlorophyll *a/b*-Verhältnis sowie (B) die Carotinoidmengen bezogen auf das Frischgewicht (FG) bestimmt. (\*) Signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,05$ ; (\*\*) sehr signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,01$

Beeinträchtigungen des metabolischen Tetrapyrrolbiosyntheseweges wurden mittels Quantifizierung von Chlorophyllvorstufen nachgewiesen. Da das ratenlimitierende Enzym GluTR eine generelle Kontrolle auf die Tetrapyrrolbiosynthese bewirkt und gewöhnlich durch nachgeschaltete Limitationen innerhalb des Stoffwechselweges reprimiert wird (Papenbrock *et al.*, 2000b; Meskauskiene *et al.*, 2001; Moulin & Smith, 2005; Shalygo *et al.*, 2009; Czarnecki & Grimm, 2012), wurde für die Quantifizierung mit ALA gefüttert, um dieser Regulation entgegenzuwirken. Blattscheiben von Wildtyp und den Antisense-Pflanzen wurden 24 h im Schwachlicht in einer gepufferten Lösung mit 1 mM ALA inkubiert. Die Menge an zugegebener ALA war gering genug, um jeglichen negativen Effekt durch zusätzlichen photooxidativen Stress während der Inkubationszeit auszuschließen. Nach erfolgter ALA-Fütterung wurden die Chlorophyllvorstufen Proto, MgProto, MgProtoME und Protochlid mittels HPLC analysiert.

**Tabelle 25:** Quantifizierung von Chlorophyllvorstufengehalten von Tabak Wildtyp und vier *LCAA*-Antisense-Linien nach Fütterung mit 1 mM ALA für 24 h bei konstanter Belichtung von 30  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 22 °C. Die Werte von drei biologischen Replikaten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Fettgedruckte Werte sind signifikant verschieden zum Wildtyp ( $p \leq 0,01$ )

	Proto	MgProto	MgProtoME	Protochlid
	[pmol g <sup>-1</sup> Frischgewicht]			
<b>Wildtyp</b>	9856 $\pm$ 1395	29 $\pm$ 5	120 $\pm$ 50	440 $\pm$ 325
<b><i>LCAA#1</i></b>	9304 $\pm$ 2444	57 $\pm$ 12	531 $\pm$ 376	363 $\pm$ 305
<b><i>LCAA#2</i></b>	7436 $\pm$ 482	109 $\pm$ 128	1031 $\pm$ 1287	331 $\pm$ 16
<b><i>LCAA#3</i></b>	<b>4246</b> $\pm$ 2185	<b>1417</b> $\pm$ 902	<b>5658</b> $\pm$ 241	300 $\pm$ 91
<b><i>LCAA#4</i></b>	<b>527</b> $\pm$ 368	301 $\pm$ 77	<b>3571</b> $\pm$ 806	182 $\pm$ 21

Die *LCAA*-Antisense-Pflanzen akkumulierten stark erhöhte Mengen MgProtoME und MgProto im Vergleich zum Wildtyp (Tabelle 25). Trotz des am stärksten ausgeprägten Phänotyps akkumulierte die Linie *LCAA#4* etwas weniger MgProto und MgProtoME als die Linie *LCAA#3*. Alle transgenen Linien wiesen zudem einen verringerten Protochlid-Gehalt auf, der mit dem beobachteten Pigmentmangel korreliert. Interessanterweise sind auch die Gehalte an Proto in den Mutanten merklich reduziert, um bis zu 95 % für die Linie *LCAA#4*, obwohl die Zugabe von ALA tendenziell eine Akkumulation dieses Chlorophyllintermediats bewirkt und die beiden folgenden Reaktionsprodukte im Mg-Zweig der Tetrapyrrolbiosynthese, MgProto und MgProtoME, angereichert werden. Nachdem die ALA-Fütterung eine Quantifizierung der Mg-Porphyrine erleichterte, wurden *steady-state*-Gehalte der Chlorophyllvorstufen in den Antisense-Pflanzen ermittelt (Tabelle 26). Die HPLC-Daten der *steady-state*-Gehalte lieferten ähnliche Unterschiede der Mg-Porphyrin-Gehalte zwischen

Wildtyp und den Antisense-Pflanzen wie nach ALA-Fütterung. Proto hingegen konnte ohne vorhergehende Inkubation mit ALA nur im Wildtyp detektiert werden. Die Akkumulationen an MgProtoME stiegen zunehmend in den *LCAA*-Linien im Vergleich zum Wildtyp an und Linie *LCAA#3* wies die höchsten Mengen auf. Die detektierten Protochlid-Gehalte von im Licht angezogenen *LCAA*-Antisense-Pflanzen waren im Vergleich zum Wildtyp verringert (Tabelle 26). Zusätzlich wurden die Protochlid-Gehalte auch nach 15 h Dunkelheit in den *LCAA*-Linien ermittelt. Relativ zu den Mengen, die am Tag in den *LCAA*-Linien gemessen wurden, akkumulierten die transgenen Pflanzen im Dunkeln etwa 10-fach mehr Protochlid, dennoch waren die Gehalte vergleichsweise zum Wildtyp graduell verringert, bis unter 20 % des Wildtyp-Levels (Tabelle 26).

**Tabelle 26:** Quantifizierung von *steady-state*-Gehalten der Chlorophyllvorstufen von Tabak Wildtyp und vier *LCAA*-Antisense-Linien unter Langtagbedingungen. Die Proben für die Protochlid-Analyse im Dunkeln wurden nach einer 15-stündigen Dunkelphase geerntet. Die Werte von vier biologischen Replikaten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Fettgedruckte Werte sind signifikant verschieden zum Wildtyp ( $p \leq 0,01$ ). (n. d.) Nicht detektierbare Gehalte des entsprechenden Porphyrins.

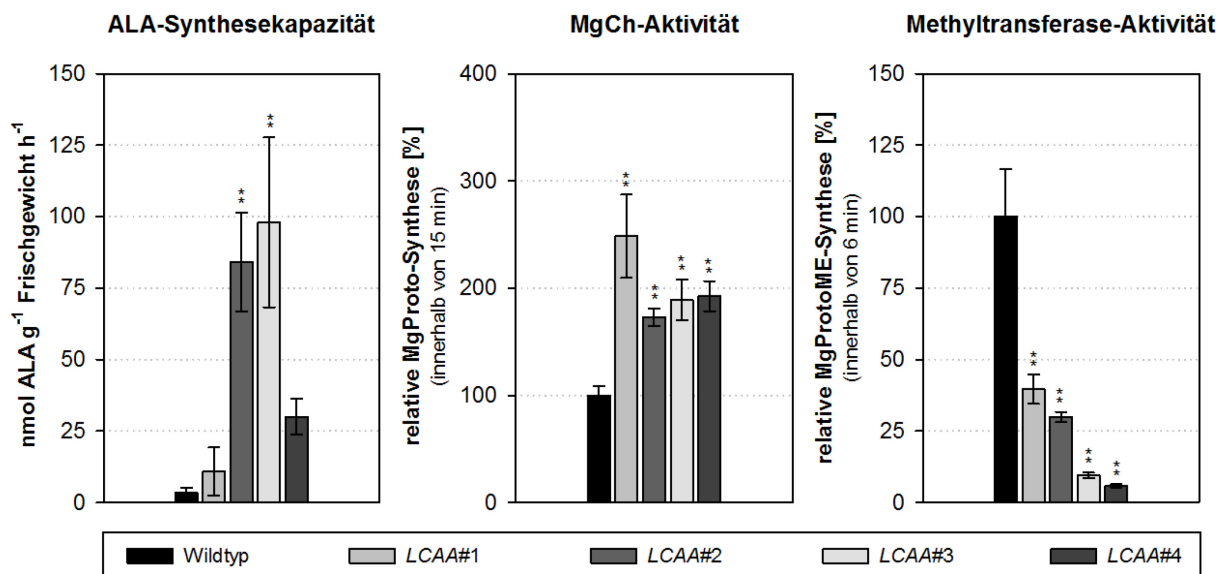
	Proto	MgProto	MgProtoME	Protochlid	Protochlid (im Dunkeln)
	[pmol g <sup>-1</sup> Frischgewicht]				
<b>Wildtyp</b>	263 $\pm$ 51	24 $\pm$ 11	11 $\pm$ 3	678 $\pm$ 149	6156 $\pm$ 674
<i>LCAA#1</i>	n. d.	55 $\pm$ 19	252 $\pm$ 187	<b>309 <math>\pm</math> 34</b>	<b>4499 <math>\pm</math> 610</b>
<i>LCAA#2</i>	n. d.	<b>163 <math>\pm</math> 97</b>	<b>2110 <math>\pm</math> 1883</b>	<b>400 <math>\pm</math> 88</b>	<b>4213 <math>\pm</math> 646</b>
<i>LCAA#3</i>	n. d.	<b>451 <math>\pm</math> 72</b>	<b>3994 <math>\pm</math> 904</b>	<b>127 <math>\pm</math> 11</b>	<b>1878 <math>\pm</math> 645</b>
<i>LCAA#4</i>	n. d.	125 $\pm$ 26	1261 $\pm$ 305	<b>133 <math>\pm</math> 16</b>	<b>1163 <math>\pm</math> 200</b>

### 3.4.3 *LCAA* ist essenziell für die Chlorophyllbiosynthese

Die deutlichen Veränderungen in den Gehalten der Chlorophyllvorstufen implizieren eine direkte Beeinträchtigung des Mg-Zweiges der Tetrapyrrolobiosynthese infolge des *LCAA*-Antisense-Effekts. Zur genaueren Klärung, wodurch die Mg-Porphyrin-Akkumulationen und Proto- oder Protochlid-Reduktionen bedingt werden, wurden die Aktivitäten wichtiger, zum Teil ratenlimitierender Enzyme in den transgenen Linien bestimmt. Die Messung der ALA-Syntheserate in Tabakblättern zeigte, dass *LCAA*-Antisense-Pflanzen interessanterweise eine höhere Synthesekapazität als der Wildtyp aufwiesen (Abbildung 32). In der Linie *LCAA#3* erreicht die ALA-Synthesekapazität mit einer zum Wildtyp fast 30-fach gesteigerten Rate einen Spitzenwert. Die höhere ALA-Syntheserate steht allerdings in einem vermeintlichen Widerspruch zu den verringerten Proto-Gehalten in den Antisense-Linien (Tabelle 25 und Tabelle 26). Hierauf könnte wiederum die Messung der MgCh-Aktivität eine Antwort geben,



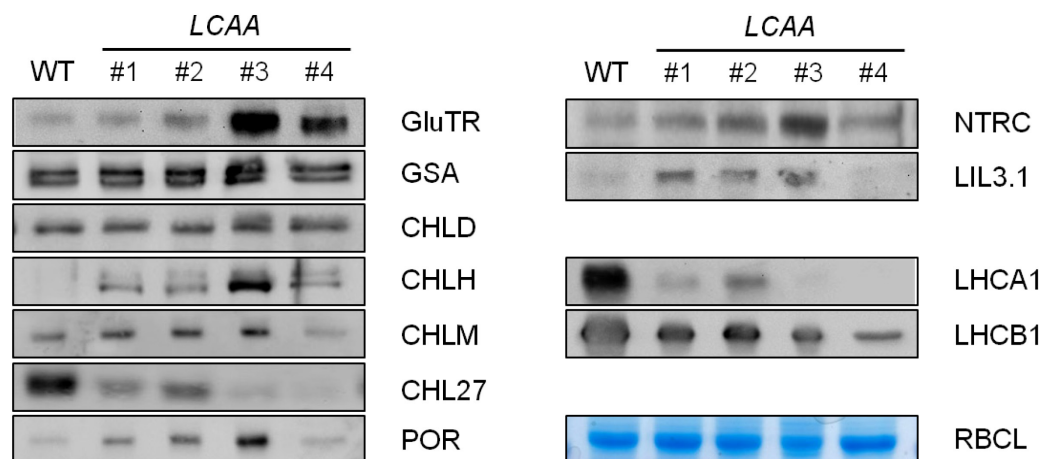
die für die transgenen Linien eine signifikante Steigerung erkennen lässt (Abbildung 32). Eine Abnahme des Substrats Proto sowie die Akkumulation des Produktes MgProto erscheinen demzufolge höchst plausibel. Die aus der Abbildung 32 ersichtliche drastische, graduelle Abnahme der Mg-Protoporphyrin-Methyltransferase-Aktivität in den *LCAA*-Antisense-Pflanzen spricht auf der einen Seite zusätzlich für eine MgProto-Anreicherung. Hingegen korrelieren auf der anderen Seite die massiven MgProtoME-Akkumulationen in den transgenen Linien nicht mit den verminderten Mg-Protoporphyrin-Methyltransferase-Aktivitäten. Bis dato können in grünen Pflanzengeweben keine Aktivitätsmessungen der Cyclase erfolgreich durchgeführt werden, deren Etablierung auch in dieser Arbeit mehrfach versucht wurde. Somit kann die MgProtoME-Akkumulation und Protochlid-Reduktion zumindest nicht anhand von Enzymkinetiken eindeutig erklärt werden.



**Abbildung 32:** Aktivitäten ausgewählter Enzyme der Tetrapyrrolbiosynthese. In Tabak Wildtyp- und *LCAA*-Antisense-Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen die ALA-Synthesekapazität und die Aktivitäten der Mg-Chelatase (MgCh) und Mg-Protoporphyrin-Methyltransferase bestimmt. Die Differenz der Produktbildung zu Beginn und zum Ende des MgCh- und Methyltransferase-Enzymassays wurde ermittelt und in Relation zur Aktivität der Enzyme im Wildtyp gesetzt. Die Messwerte für den Wildtyp entsprechen folglich 100 %. (\*\*) Sehr signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,01$ ; ALA-Synthesekapazität:  $n = 3$ , MgCh- und Methyltransferase-Aktivität:  $n = 6$

Um den molekularen Hintergrund der veränderten Enzymaktivitäten in den Antisense-Pflanzen zu verstehen, wurden daher u. a. Schlüsselenzyme der Tetrapyrrolbiosynthese mittels Western-Blot-Verfahren untersucht. Auffällig war sogleich, dass die erhöhte ALA-Synthesekapazität und MgCh-Aktivität mit erhöhten GluTR- bzw. CHLH-Proteingehalten einhergingen (Abbildung 33). Darüber hinaus konnte eine graduelle Zunahme im Proteingehalt von CHLM und POR im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden, die

wiederum umgekehrt mit einem reduzierten Chlorophyllgehalt und im Fall von CHLM ebenso wenig mit der verringerten Methyltransferase-Aktivität der *LCAA*-Linien korrelieren. Im Gegensatz dazu war CHL27 deutlich weniger abundant in den Antisense-Pflanzen als im Wildtyp. Generell sind geringere CHL27-Proteinmengen eine Indikation für eine reduzierte Cyclase-Reaktion (Tottey *et al.*, 2003; Peter *et al.*, 2010), wodurch sich schließlich auch die in den Mutanten detektierten MgProtoME-Substratakkumulationen und Verringerungen des Protochlid-Produktes erklären ließen. Die Gehalte von GSA und CHLD in den *LCAA*-Antisense-Pflanzen variierten im Vergleich zum Wildtyp nicht.



**Abbildung 33:** Analyse der Abundanz wichtiger Proteine in den *LCAA*-Antisense-Linien mittels Immunodetektion. Gleiche Proteinmengen von Gesamtproteinextrakten aus Blättern von Tabak Wildtyp (WT) und vier *LCAA*-Antisense-Linien wurden beladen. Die zu analysierenden Enzyme waren die GluTR, die Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase (GSA), die MgCh-Untereinheiten CHLD und CHLH, die Mg-Protoporphyrin-Methyltransferase CHLM, die CHL27-Untereinheit der Cyclase und POR. Zusätzlich wurden LIL3.1, NTRC und die Lichtsammelkomplexproteine LHCA1 und LHCB1 analysiert. Die Gehalte für GluTR, CHLH, CHLM und POR sowie für NTRC und LIL3.1 sind in den transgenen Linien erhöht. Hingegen ist die Abundanz von CHL27 und der stellvertretenden chlorophyllbindenden Proteine LHCA1 und LHCB1 deutlich in den Mutanten reduziert. Die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RBCL) diente als Kontrolle für die Auftragung gleicher Proteinmengen.

Veränderungen von Enzymgehalten sind folglich nur für spezifische Schritte der Tetrapyrrolbiosynthese zu verzeichnen, während andere Enzymschritte aufgrund der *LCAA*-Defizienz nicht betroffen zu sein scheinen. Im Weiteren wurden die Proteingehalte von LIL3.1 und der NADPH-abhängigen Thioredoxin-Reduktase C (NTRC) untersucht. LIL3.1, eine von zwei Isoformen, gehört wie einleitend beschrieben (Abschnitt 1.4) zur LHC-ähnlichen Proteinfamilie, welches mit der Geranylgeranyl-Reduktase, ein Enzym der späten Schritte der Chlorophyllbiosynthese, interagiert und sie stabilisiert (Tanaka *et al.*, 2010). NTRC könnte die aerobe Cyclase vor oxidativen Stress schützen (Stenbaek *et al.*, 2008). Abgesehen von der am stärksten beeinträchtigten Linie *LCAA*#4, sind die Gehalte von LIL3.1

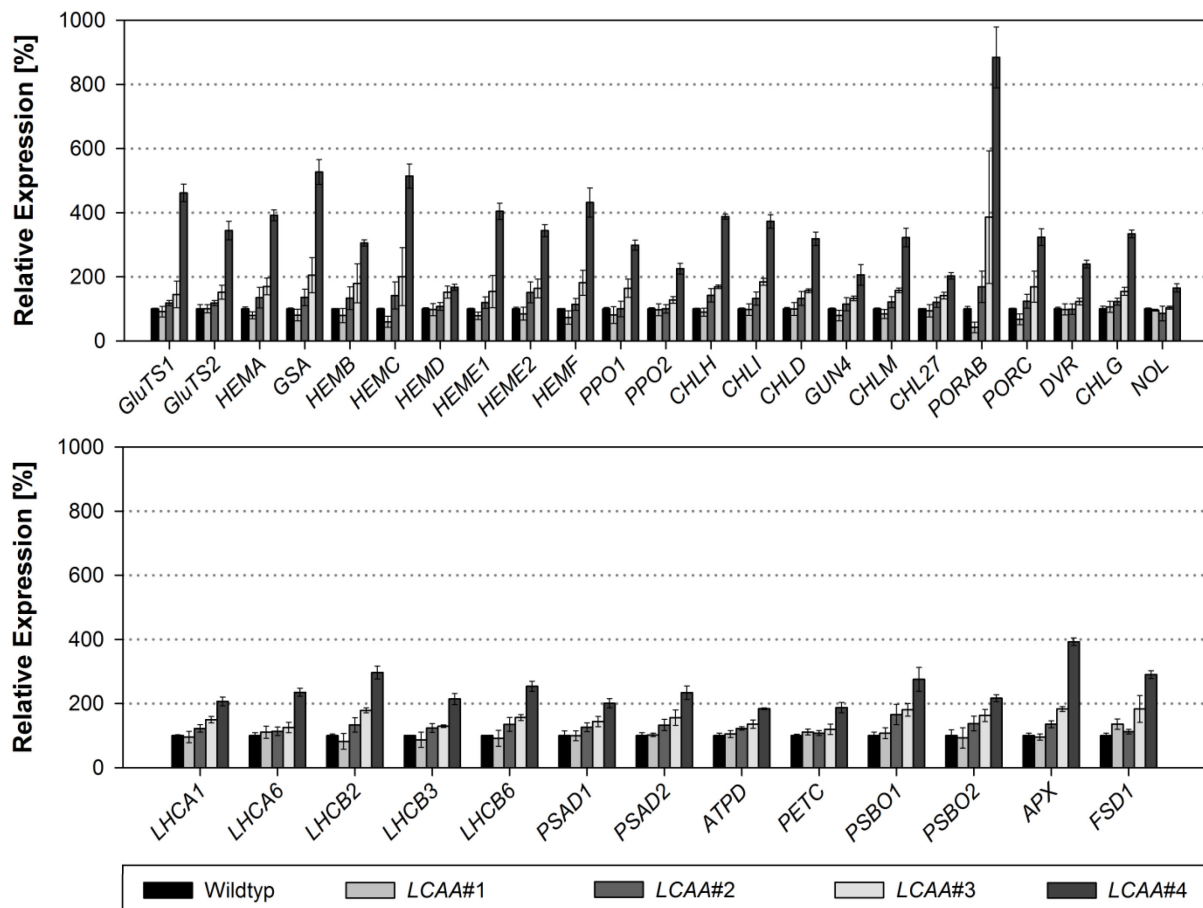


und NTRC in allen Antisense-Linien erhöht. Um ferner die Vermutung einer reduzierten LHC-Akkumulation aufgrund der erhöhten Chlorophyll *a/b*-Verhältnisse in den transgenen Linien zu bestätigen, wurden stellvertretend die Gehalte an LHCA1 und LHCB1 analysiert. Den Erwartungen entsprechend waren deutliche graduelle Reduktionen der LHC-Proteine in den Mutanten zu verzeichnen.

Zum besseren Verständnis der veränderten Proteingehalte in den *LCAA*-Linien wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Christin Albus und Dr. Mark A. Schöttler (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm) Transkriptabundanz mittels qPCR von 23 Genen analysiert, die Komponenten der Tetrapyrrolbiosynthese kodieren (Abbildung 34 oben). Während in den meisten Fällen die Transkriptgehalte in den schwächeren Antisense-Linien *LCAA#1* und *LCAA#2* kaum oder nicht signifikant zum Wildtyp verändert waren, zeigten die stärkeren Antisense-Linien *LCAA#3* und vor allem *LCAA#4* verstärkte Expressionssteigerungen von allen getesteten Tetrapyrrolbiosynthese-involvierten Genen (Abbildung 34 oben). Die stärkste, nahezu achtfach erhöhte Transkriptakkumulation für *LCAA#4* konnte für *PORA* und *PORB* verzeichnet werden, die zwei Isoformen der NADPH-abhängigen Protochlid-Oxidoreduktase kodieren. *PORC*, das die dritte Isoform kodiert, war in *LCAA#4* vergleichsweise nur um das dreifache hochreguliert. Die Expression von *CHL27*, deren Genprodukt deutlich in den Tabak-Antisense-Pflanzen verringert war (Abbildung 33), war nur schwach, aber signifikant in den *LCAA*-Linien erhöht, dahin deutend, dass ein spezifischer Verlust von *CHL27* nicht zwangsläufig einer Repression dessen Genexpression zugeschrieben werden kann.

Zur Vervollständigung wurden ebenfalls in Zusammenarbeit mit Dr. Christin Albus und Dr. Mark A. Schöttler (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm) auch Gene analysiert, die Komponenten des Photosyntheseapparates und des antioxidativen Systems kodieren (Abbildung 34 unten). Hierbei zeigten auch die Expressionen von *LHCA1*, *LHCA6*, *LHCB2*, *LHCB3*, und *LHCB6* eine zwei- bis dreifache Hochregulation in *LCAA#4* im Vergleich zum Wildtyp im Unterschied zur detektierten verringerten LHC-Proteinakkumulation (Abbildung 33). Auch die Linie *LCAA#3* zeigt eine ähnliche, wenn auch etwas schwächere Tendenz zur erhöhten LHC-Expression, sodass eindeutig verminderte Proteingehalte, wie die der LHCs, nicht auf erniedrigte Genexpressionen zurückzuführen sind. Zusätzlich waren etwa zweifach erhöhte Transkriptakkumulationen in der Linie mit dem stärksten Phänotyp für folgende Gene zu detektieren: *ATPD* (kodiert die D-Untereinheit der

ATP-Synthase in den Chloroplasten), *PETC* (kodiert das essenzielle Rieske-Eisen-Schwefel-Protein des Cytochrom- $b_6f$ -Komplexes) und die zwei Isoformen von *PSBO* (kodieren für eine extrinsische und regulatorische Untereinheit des Photosystems II) und von *PSAD* (kodieren für die Untereinheit II des Photosystems I).



**Abbildung 34:** qPCR-Analyse zur Quantifizierung von Transkriptakkumulationen von Genen, die in die Tetrapyrrolbiosynthese (obiges Diagramm) sowie die Photosynthese und das antioxidative System der Chloroplasten (unteres Diagramm) des Tabak Wildtyps und der *LCAA*-Antisense-Linien involviert sind. Die Pflanzen wurden in Phytokammern unter Langtagbedingungen bei  $250 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$  angezogen. Die bzgl. der Referenzgene normierten Expressionen wurden in Relation zur jeweiligen Genexpression im Wildtyp gesetzt. Die Messwerte für den Wildtyp entsprechen folglich 100 %. Details zu dem Design und den Sequenzen der Primer sind der Tabelle 30 im Anhang zu entnehmen. Die Datengewinnung und grafische Darstellung wurde im Rahmen der Kooperation von Dr. Christin Albus und Dr. Mark A. Schöttler (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm) durchgeführt und der gemeinsamen Publikation entnommen (Albus *et al.* (2012), Abb. 7, modifiziert).

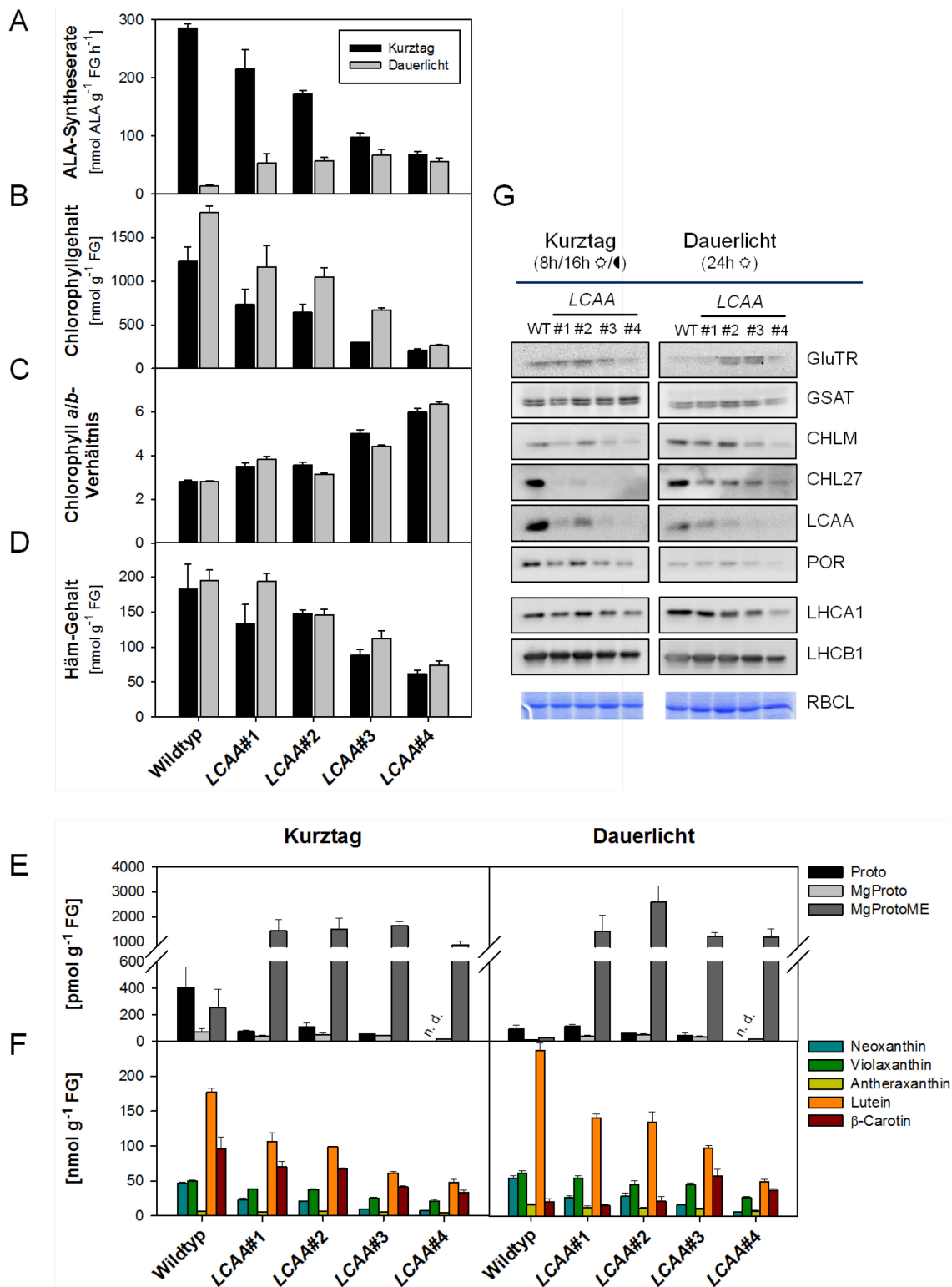
Ebenso signifikant verstärkt exprimiert waren in den Linien *LCAA#3* und *LCAA#4* die zwei Gene des antioxidativen Systems, *APX* (für Ascorbat-Peroxidase) und *FSD1* (die große chloroplastidäre Isoform der Superoxid-Dismutase). Da der spezifische Verlust an *CHL27*-Proteinmengen in den *LCAA*-Antisense-Pflanzen nicht mit einer reprimierten *CHL27*-

Genexpression einhergeht, war anzunehmen, dass möglicherweise eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen LCAA und CHL27 für eine stabile CHL27-Abundanz erforderlich ist. Durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation konnte in Kooperation mit Maxi Rothbart erfolgreich die physikalische Interaktion von LCAA mit CHL27 sowie die Bildung von LCAA-Homodimeren bestätigt werden (Albus *et al.*, 2012).

### 3.4.4 Tageslängenabhängige Auswirkungen der LCAA-Defizienz

Vergangene Arbeiten mit Cyclase-defizienten Tabak-Pflanzen belegten tageslängenabhängige Auswirkungen auf den Phänotyp von *CHL27*-Antisense-Linien (Peter *et al.*, 2010). Im Vergleich zu den Pflanzen, die im Dauerlicht angezogen wurden, waren die Blätter der im Tag-Nacht-Rhythmus kultivierten *CHL27*-Antisense-Linien deutlich stärker chlorotisch und nekrotisch. In diesem Zusammenhang war es überraschend, dass die hier analysierten *LCAA*-Antisense-Linien trotz vergleichbar hohen MgProtoME-Akkumulationen unter den getesteten Langtagbedingungen allgemein keine Nekrosen aufwiesen.

Um die Tolerierung der Phototoxizität näher zu beleuchten, wurden zusätzlich die transgenen Linien unter Kurztagbedingungen und Dauerlicht untersucht. Die Ergebnisse zeitgleich detektierter Messungen unter gleichen Lichtintensitäten von  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sind in der Abbildung 35 vergleichend dargestellt. Phänotypisch war lediglich im Dauerlicht ein schnelleres Wachstum für Wildtyp und Mutanten zu verzeichnen (nicht gezeigt). Die physiologischen Messungen betrachtend, fällt jedoch als erstes die augenscheinliche, graduelle Abnahme der ALA-Synthesekapazität von den im Kurztag angezogenen *LCAA*-Antisense-Pflanzen auf, die diametral zur Syntheserate unter Dauerlicht verläuft (Abbildung 35A). Zusätzlich verdeutlicht die Gegenüberstellung beider Aktivitäten den grundsätzlich geringeren Bedarf fortwährend synthetisierter ALA bei Dauerbelichtung. So wies der Wildtyp unter Dauerlicht eine um den Faktor 20 erniedrigte ALA-Synthesekapazität im Vergleich zum Kurztag auf. Nichtsdestoweniger waren die Gesamtchlorophyllgehalte in den Blättern der im Dauerlicht kultivierten Pflanzen prinzipiell höher als jene unter Kurztagbedingungen (Abbildung 35B). Aber analog zu den Langtagbedingungen korreliert der chlorotische Phänotyp der transgenen Linien mit den graduell verringerten Chlorophyllgehalten unter Kurztagbedingungen, wie auch im Dauerlicht (Abbildung 35B). Ein ebenso bekanntes Bild zeigt sich im Chlorophyll *a/b*-Verhältnis, das unter beiden getesteten Bedingungen sukzessive bis zur Verdopplung bei *LCAA#4* anstieg (Abbildung 35C).



**Abbildung 35:** Vergleich physiologischer Parameter und wichtiger Proteinabundanzen von Tabak Wildtyp (WT) und den *LCAA*-Antisense-Linien in Abhängigkeit unterschiedlicher Längen der Lichtphasen. Unter Kurztagbedingungen (8 h Licht) gegenüber der Anzucht im Dauerlicht (24 h Licht) bei konstanter Lichtintensität ( $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurden folgende Parameter bezogen auf das Frischgewicht (FG) bestimmt: (A) ALA-Synthesekapazität, (B) Gesamt-chlorophyllgehalt, (C) Chlorophyll *a/b*-Verhältnis, (D) Häm-Gehalt, (E) Porphyrin- und Mg-Porphyringehalte [(n. d.) nicht detektierbar] und (F) Pigmentgehalte. Zudem wurden (G) die Gehalte von Proteinen, die an der Chlorophyllbiosynthese beteiligt sind bzw. Chlorophyll binden im Kurztag und Dauerlicht analysiert.

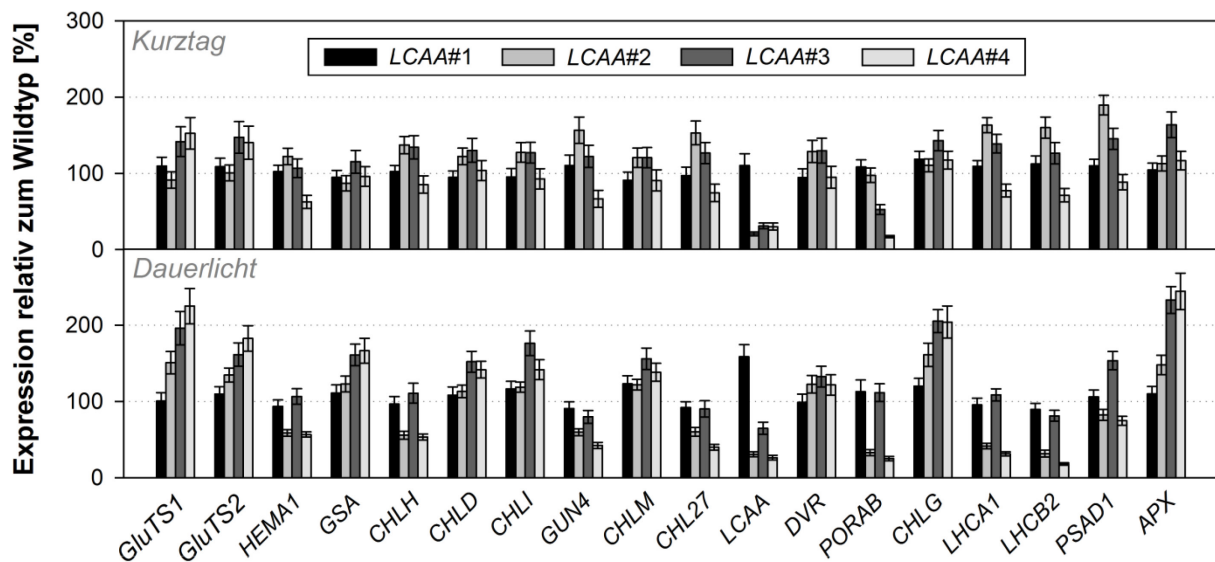
Vergleichbar mit den Chlorophyllgehalten war zwar die Menge von nicht kovalent gebundenem Häm im Dauerlicht gegenüber den Kurztagbedingungen tendenziell in allen Linien erhöht, doch deutlich in den transgenen Pflanzen im Kurztag und Dauerlicht vergleichsweise zum Wildtyp herabgesetzt (Abbildung 35D). Verringerte Häm-Gehalte waren höchstwahrscheinlich durch die für beide Tageslängen detektierte Proto-Reduktion bedingt (Abbildung 35E).

Während der Wildtyp im Dauerlicht nahezu 90 % weniger MgProtoME akkumulierte als unter Kurztagbedingungen, blieb in den Antisense-Linien unter beiden Anzuchtbedingungen der signifikant zum Wildtyp gesteigerte MgProtoME-Gehalt etwa auf dem gleichen Niveau (Abbildung 35E). Entsprechend den Beobachtungen zu den Pigmentgehalten in den transgenen Linien unter Langtagbedingungen (vgl. Abbildung 31B) zeigte sich ebenso für den Kurztag und die Dauerbelichtung eine graduelle Xanthophyll-Abnahme (Abbildung 35F). Einzig der Gehalt an  $\beta$ -Carotin war im Dauerlicht in den Linien *LCAA#3* und *LCAA#4* knapp drei- bzw. zweifach erhöht.

In Korrelation zu der geringeren ALA-Syntheserate waren tendenziell die GluTR-Proteingehalte in den Antisense-Linien unter Kurztagbedingungen im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abbildung 35G). Hingegen zeigte sich in dauerbelichteten Blättern analog zum Langtag für die Mutanten eine verstärkte GluTR-Expression. Diese Ergebnisse können als Indiz dafür gewertet werden, dass *LCAA* abhängig von der Lichtdosis einen regulatorischen Einfluss auf die frühen Schritte der Tetrapyrrolbiosynthese ausübt. Tageslängenunabhängig waren Verringerungen für *CHL27*, *LCAA*, *LHCA1* und *LHCB1* zu detektieren. Im Gegensatz zu den immunologischen Analysen unter Langtagbedingungen konnte weder unter Kurztagbedingungen noch im Dauerlicht eine Proteinakkumulation von *CHLM* und *POR* nachgewiesen werden.

Um die Auswirkungen der Tageslänge auf Transkriptebene in den *LCAA*-Antisense-Linien zu untersuchen, wurden Expressionen einer Auswahl an Genen analysiert, die in die Tetrapyrrolbiosynthese, Photosynthese und das antioxidative System der Chloroplasten involviert sind (Abbildung 36). Hierbei wurden die Proben zwei Stunden nach Belichtungsbeginn, bzw. bei den dauerbelichteten Pflanzen entsprechend zeitgleich, geerntet. Im Gegensatz zur umfassenden Transkriptabundanzanalyse unter Langtagbedingungen (vgl. Abbildung 34) wurden in den Pflanzen unter Kurztagbedingungen oder im Dauerlicht keine generell starken Expressionssteigerungen für alle getesteten Gene detektiert. Insbesondere die

Linie *LCAA#4* war nach Anzucht im Kurztag sowie im Dauerlicht für viele tetrapyrrolbiosynthese- und photosyntheserelevanten Gene im Vergleich zum Wildtyp reprimiert. Für die weniger stark beeinträchtigten Linien *LCAA#2* und *LCAA#3* zeigten sich im Kurztag jedoch nahezu alle analysierten Gene 1,5- bis 2-fach stärker exprimiert als im Wildtyp. Die im Kurztag in den Mutanten verzeichnete Verringerung der ALA-Syntheserate (vgl. Abbildung 35A) geht demnach nicht mit einer graduellen Transkriptreduktion von *HEMA1* einher. Den Erwartungen entsprechend war *LCAA* in den Antisense-Pflanzen, abgesehen von der Linie *LCAA#1* mit dem schwächsten Phänotyp, herunter reguliert. Zudem spiegelt sich der geringere POR-Proteingehalt in der *PORAB*-Transkriptabundanz wider, die in den transgenen Linien schrittweise verringert war.

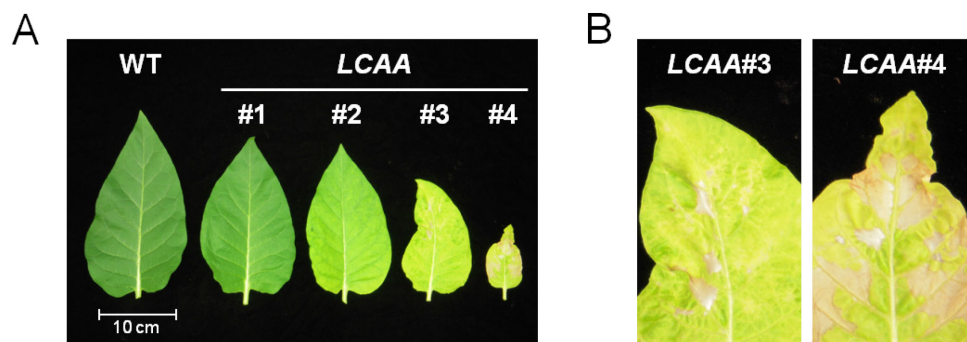


**Abbildung 36:** Vergleichende Expressionsanalyse ausgewählter Gene in *LCAA*-Antisense-Linien mittels qPCR in Abhängigkeit unterschiedlicher Längen der Lichtphasen. Unter Kurztagbedingungen (obiges Diagramm) und im Dauerlicht (unteres Diagramm) wurden. Transkriptakkumulationen von Genen, die in die Tetrapyrrolbiosynthese, Photosynthese und das antioxidative System der Chloroplasten involviert sind, quantifiziert. Die Genexpressionen sind in Prozent relativ zum Wildtyp (100 %) angegeben.

Im Dauerlicht konvergierten die jeweiligen Genexpressionen gegenüber den Kurz- oder Langtagbedingungen deutlich weniger. So waren einerseits die Transkriptgehalte für die zwei Isoformen der Glutamyl-tRNA-Synthase (*GluTS1* und *2*), der Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase (*GSA*), den Mg-Chelatase-Untereinheiten *CHLD* und *CHLI*, die Mg-Protoporphyrin-Methyltransferase (*CHLM*) und die Chlorophyll-Synthase (*CHLG*) in den Antisense-Linien graduell stärker exprimiert. Andererseits waren fünf der tetrapyrrolbiosyntheserelevanten Gene in den transgenen Linien mit Ausnahme der Linie *LCAA#3* im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Darunter *HEMA1*, obwohl die

Mutanten im Dauerlicht eine erhöhte ALA-Synthesekapazität aufweisen. Auch die Schlüsselgene *CHLH* und *GUN4*, die für die katalytische Untereinheit der Mg-Chelatase bzw. einen Regulator dieser Chelatase kodieren, sowie *CHL27* und *PORAB* waren herunter reguliert. Darüber hinaus wurde eine deutliche Verringerung der LHC-Transkriptabundanzen bis auf unter 20 % des Wildtyp-Expressionslevels in den dauerbelichteten Linien *LCAA#2* und *LCAA#4* detektiert. Im Unterschied zu den Kurztagbedingungen zeigte sich in den transgenen Linien im Dauerlicht eine 3,5-fache Expressionssteigerung von *APX*, dessen Genprodukt zur Detoxifikation von Wasserstoffperoxid beiträgt und einen Einfluss ROS-vermittelter Expressionsregulation impliziert.

Während auch unter Kurztagbedingungen oder im Dauerlicht phänotypisch keine auffälligen, phototoxischen Schädigungen ersichtlich waren, war es um so überraschender, dass im Kurztag (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) kultivierte Mutanten, nachdem diese anschließend Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) ausgesetzt wurden, makroskopisch erkenntliche nekrotische Läsionen in den Blättern ausbildeten. Der Tabak Wildtyp und die transgenen Linien *LCAA#1* und *LCAA#2* zeigten keine phänotypischen Veränderungen nach der Umstellung von Kurztag- auf Langtagbedingungen (Abbildung 37A). Jedoch traten bei den am stärksten chlorotischen Linien *LCAA#3* und *LCAA#4* großflächige, nekrotische Blattareale auf (Abbildung 37B).



**Abbildung 37:** Ausbildung großflächiger Nekrosen in den Blättern der Antisense-Linien *LCAA#3* und *LCAA#4* unter Langtagbedingungen nach vorhergehender Kurztagadaptation. (A) Repräsentativ sind hierfür die drittjüngsten Blätter des Tabak Wildtyps und der vier *LCAA*-Antisense-Linien dargestellt. (B) Vergrößerte Bildausschnitte veranschaulichen die nekrotischen Blattareale von *LCAA#3* und *LCAA#4*.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen konkludiert werden, dass die *LCAA*-Defizienz neben der regulatorischen Wirkung auf die Tetrapyrrolbiosynthese, die eher auf posttranslationaler Ebene erfolgt, auch in Abhängigkeit von der Länge der Lichtphase eine

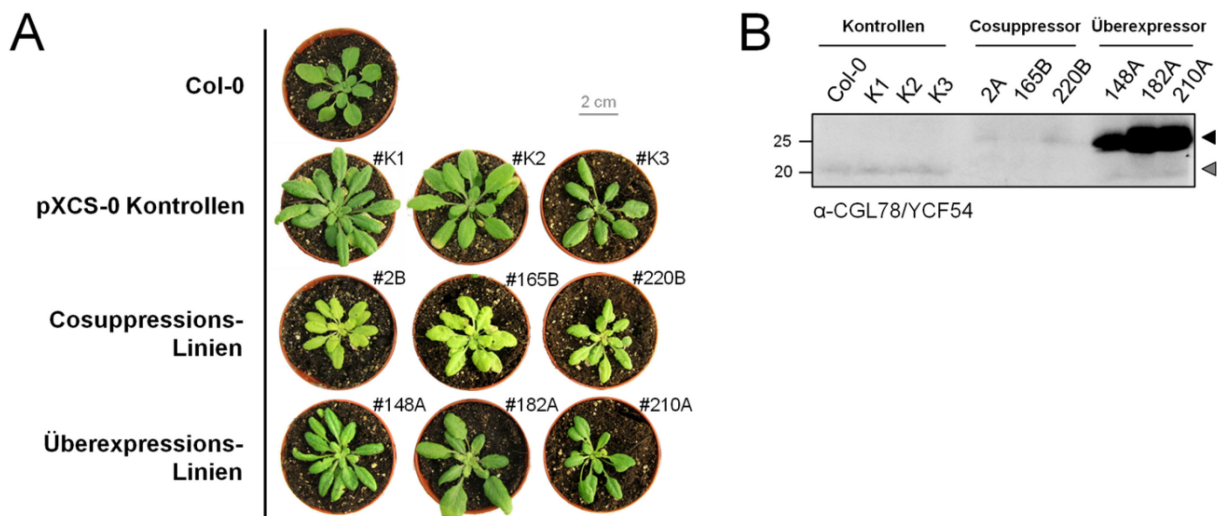
Änderung der Expression tetrapyrrolbiosynthese- und photosyntheserelevanter Proteine bewirkt.

### 3.4.5 Stabile Überexpression des homologen YCF54-Proteins in höheren Pflanzen

Nachdem die Effekte verminderter LCAA-Proteingehalte näher untersucht wurden, stellte sich die Frage nach den physiologischen Konsequenzen einer LCAA-Überexpression. Da *Nicotiana silvestris* als jüngster Abkömmling des maternalen Genom-Donors des allotetraploiden Tabaks angesehen wird, wurde dessen cDNA für die Amplifikation der kodierenden Sequenz von *LCAA* zur Generierung konstitutiver *LCAA*-Überexpressor-Tabakpflanzen genutzt. Das mit dem Primerpaar NsLCAA-fl\_SmaI\_fw und NsLCAA-fl\_SmaI\_rev amplifizierte 683 bp große Fragment wurde über die Restriktionsschnittstelle SmaI in den binären Vektor pGL1 kloniert und agrobakterienvermittelt in *Nicotiana tabacum* transformiert. Die Analyse zu den Pflanzen der zweiten und dritten Generation steht allerdings hierbei noch aus. Parallel wurde für *Arabidopsis*-Pflanzen, deren Genom vollständig sequenziert vorliegt (Arabidopsis Genome, 2000), eine Überexpression des *LCAA*-orthologen Gens *AT5G58250* erzielt, dessen Genprodukt eine Länge von 211 Aminosäuren aufweist. Unter Verwendung von genomischer DNA aus *Arabidopsis* und dem Primerpaar AtLCAA\_ClaI\_fw und AtLCAA\_XmaI\_rev wurde das Gen *AT5G58250* amplifiziert. Das 817 bp große Fragment wurde final über die Restriktionsschnittstellen ClaI und XmaI in den binären Vektor pXCS-HA-Strep kloniert. Mithilfe des Agrobakterienstamms GV3103 erfolgte die stabile Transformation in *Arabidopsis*. Nach erfolgreicher BASTA<sup>®</sup>-Selektion konnten mehr als zweihundert Primärtransformanten gewonnen werden. Überraschenderweise wies ein Großteil der Primärtransformanten einen chlorotischen Phänotyp auf, der nach genauerer Untersuchung mit einem verringerten AtLCAA-Proteingehalt und deutlichen MgProtoME-Akkumulationen einherging (Daten zu den Primärtransformanten nicht gezeigt). Infolge von RNA-Interferenz kann unter Umständen eine sogenannte transgenvermittelte Cosuppression zur Stilllegung des korrespondierenden, endogenen Gens hervorgerufen werden. Da bislang keine T-DNA-Insertionsmutanten von *Arabidopsis* zur Verfügung stehen, die das Gen *AT5G58250* betreffen (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>), wurde die Cosuppression gegenüber der Überexpression anhand von je drei unabhängigen Linien der zweiten Generation mit analysiert. Zusätzlich zum Wildtyp Col-0 dienten *Arabidopsis*-Pflanzen, die mit dem leeren Vektor pXCS-HA-Strep transformiert wurden, als Kontrollen (Bezeichnung K1 bis K3). Unter Betreuung der Masterstudentin Josephine Herbst (2014) wurden die



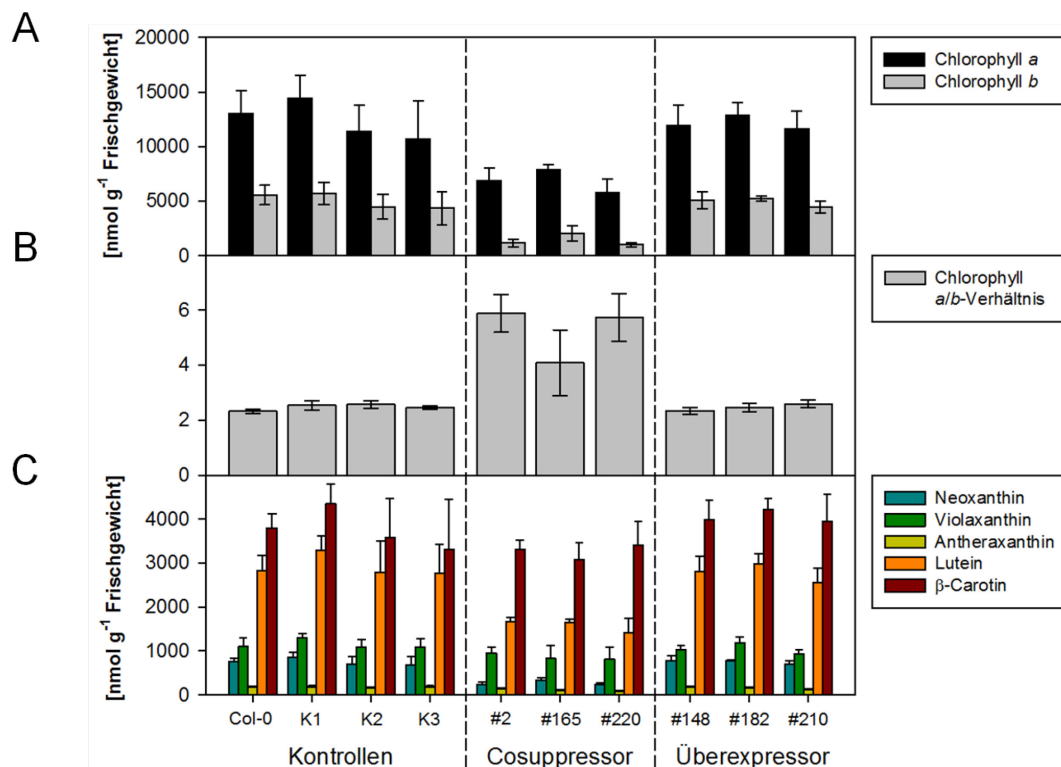
nachfolgenden Ergebnisse generiert. In der Abbildung 38 sind die repräsentativen Linien für die Cosuppression und die Überexpression gezeigt. Die drei cosupprimierten Linien wiesen im Vergleich zu den Kontrollen einen deutlich chlorotischen Phänotyp auf (Abbildung 38A), der mit einer sichtbaren Verringerung des Proteingehalts von AtLCAA korreliert (Abbildung 38B). Makroskopisch unterschieden sich hingegen die AtLCAA-HA-Strep-überexprimierenden Pflanzen nicht von den Kontroll-Linien, bzw. vom Wildtyp. Immunologisch konnten für die Überexpressoren starke Akkumulationen des AtLCAA-HA-Strep-Fusionsproteins nachgewiesen werden (Abbildung 38B).



**Abbildung 38:** Repräsentative Cosuppressions- und Überexpressions-Linien von *Arabidopsis* nach AtLCAA-HA-Strep-Expression. (A) Vergleichend zum Wildtyp Col-0 sind die Phänotypen von einer repräsentativen Pflanze von je drei pXCS-0-Kontroll-Linien (mit dem leeren Vektor pXCS-HA-Strep transformiert) sowie Cosuppressions- und Überexpressions-Linien gezeigt. Die Pflanzen wurden im Tag-Nacht-Rhythmus (10 h Licht, 10 h Dunkelheit) bei etwa  $90 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. (B) Die korrelierende Proteinabundanz von endogen exprimiertem AtLCAA (grauer Pfeil; 24,1 kDa) bzw. transgen exprimiertem AtLCAA-HA-Strep (schwarzer Pfeil; 26,7 kDa) wurde unter Verwendung des anti-CGL78/YCF54-Antikörpers nachgewiesen. Die dargestellten Ergebnisse erzeugte Josephine Herbst im Rahmen ihrer unter meiner Betreuung durchgeführten Masterarbeit.

Erwartungsgemäß war der Chlorophyllgehalt in den chlorotischen Cosuppressions-Linien auffallend erniedrigt. Chlorophyll *b* war in den cosupprimierten Linien im Vergleich zu den Kontrollen mit einer durchschnittlichen Reduktion von 55 % bis sogar 80 % stärker verringert als Chlorophyll *a*, dessen Gehalt auf 74 % bis 40 % des Kontrollniveaus sank (Abbildung 39A). Folglich war das Chlorophyll *a/b*-Verhältnis in den Cosuppressor-Linien #2 und #220 vergleichsweise zu den Kontrollen mehr als verdoppelt (Abbildung 39B). In den Überexpressions-Linien akkumulierten ähnlich hohe Mengen an Chlorophyll *a* und *b* wie im Wildtyp oder in den Kontroll-Linien, sodass ein relativ zu den Kontrollen unverändertes

Chlorophyll *a/b*-Verhältnis resultierte (Abbildung 39B). Eine stöchiometrische Veränderung in der Zusammensetzung der LHCs scheint demnach nicht durch eine erhöhte AtLCAA-Expression hervorzugehen. Ein Blick auf die Pigmentzusammensetzung der Cosuppressor- und Überexpressor-Linien gegenüber den Kontrollen verdeutlichte ein den Chlorophyllmessungen entsprechendes Ergebnis. Verringerte Xanthophyllgehalte wurden in den cosupprimierten Pflanzen detektiert, indes wildtyp- und kontrollähnliche Akkumulationen von Carotinoiden in den Überexpressoren aufgezeigt werden konnten (Abbildung 39C).



**Abbildung 39:** Quantifizierung der Pigmentgehalte von *Arabidopsis* cosupprimierten und AtLCAA-HA-Strep-überexprimierenden Linien in Relation zum Wildtyp Col0 und drei Kontroll-Linien. Die im Kurztag (10 h Licht, 10 h Dunkelheit) bei etwa  $90 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogenen Pflanzen wurden hinsichtlich ihres (A) Chlorophyll *a*- und *b*-Gehalts, (B) entsprechenden Chlorophyll *a/b*-Verhältnisses und (C) Carotinoidgehalts analysiert. Die Experimente wurden von Josephine Herbst durchgeführt, die während ihrer Masterarbeit von mir betreut wurde.

Die weiteren physiologischen Messungen zu den Gehalten der Chlorophyllvorstufen bestätigten die bereits in den Primärtransformanten detektierten MgProtoME-Akkumulationen für die cosupprimierten Linien. So war in der Linie #2 der MgProtoME-Gehalt im Vergleich zu den Kontrollen auf das 65- bis über 80-fache erhöht (Tabelle 27). Ebenso reicherte sich MgProto in den Blättern der Cosuppressoren an, während Protochlid entgegengesetzt zu den MgPorphyrin-Gehalten verringert war. Die *steady-state*-Gehalte der Chlorophyllvorstufen der

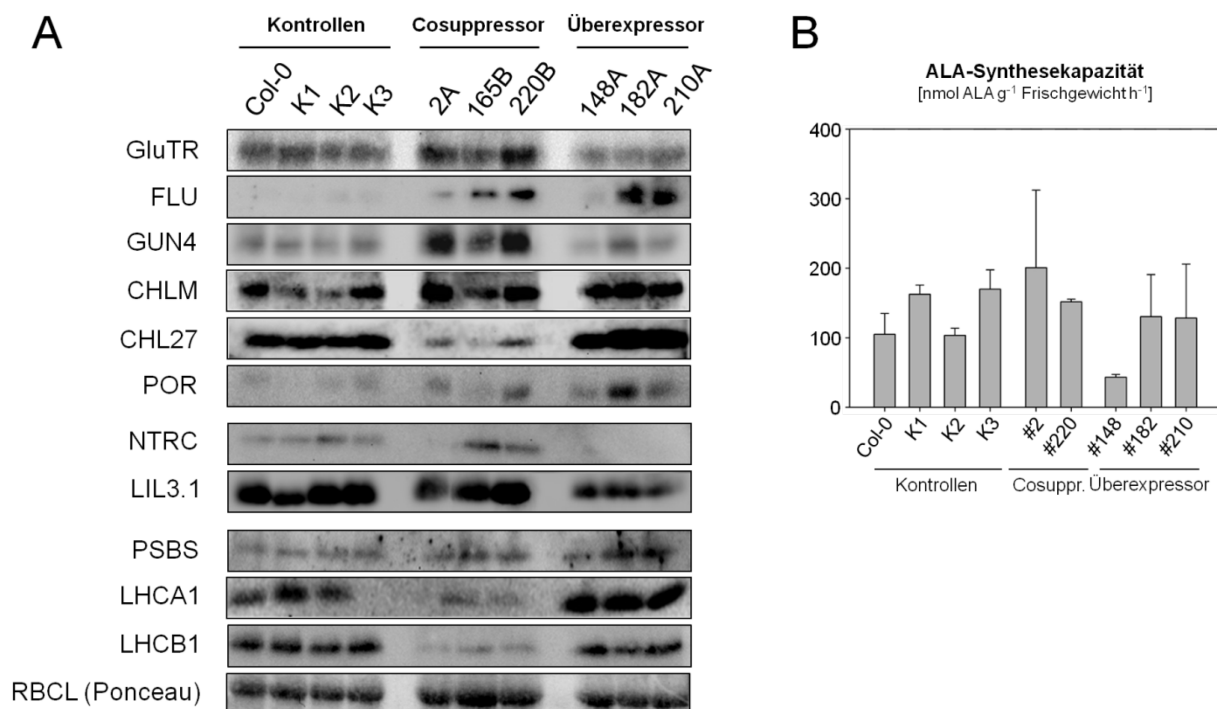
Überexpressions-Linien waren generell nicht auffällig verändert im Vergleich zu den Kontrollen.

**Tabelle 27:** *Steady-state*-Gehalte der Chlorophyllvorstufen von *Arabidopsis* Wildtyp, drei Kontroll-Linien und je drei cosupprimierten und AtLCAA-überexprimierenden Linien. Die Kontroll-Linien K1 bis K3 wurden mit dem leeren Vektor pXCS-HA-Strep transformiert. Die Proben wurden 2 h nach Belichtung im Kurztag geerntet. Die Werte von mindestens drei biologischen Replikaten je Linie sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. (n. d.) Nicht detektierbare Gehalte des entsprechenden Mg-Porphyrins. Die Quantifizierungen erzeugte Josephine Herbst im Rahmen ihrer unter meiner Betreuung durchgeführten Masterarbeit.

		MgProto	MgProtoME	Protochlid	Chlid
		[nmol g <sup>-1</sup> Frischgewicht]			
Kontrollen	Col-0	n. d.	n. d.	12,4 $\pm$ 6,10	242 $\pm$ 26,3
	K1	n. d.	0,73 $\pm$ 0,55	40,9 $\pm$ 3,23	501 $\pm$ 131
	K2	n. d.	0,94 $\pm$ 0,94	28,8 $\pm$ 8,94	1349 $\pm$ 596
	K3	n. d.	0,91 $\pm$ 0,10	20,7 $\pm$ 20,6	1264 $\pm$ 1048
Cosuppressor	#2	1,83 $\pm$ 0,41	61,3 $\pm$ 15,7	5,49 $\pm$ 1,79	377 $\pm$ 54,6
	#165	1,24 $\pm$ 0,45	45,1 $\pm$ 12,8	10,5 $\pm$ 6,62	163 $\pm$ 49,8
	#220	1,01 $\pm$ 0,24	30,0 $\pm$ 10,4	12,6 $\pm$ 5,15	373 $\pm$ 135
Überexpressor	#148	0,10 $\pm$ 0,20	1,68 $\pm$ 0,18	23,9 $\pm$ 11,4	2461 $\pm$ 1603
	#182	0,15 $\pm$ 0,18	1,65 $\pm$ 1,65	35,0 $\pm$ 5,67	953 $\pm$ 715
	#210	0,11 $\pm$ 0,12	1,26 $\pm$ 0,15	21,1 $\pm$ 6,87	677 $\pm$ 397

Ferner sollten immunologische Nachweise der Abundanzen von Proteinen, die in die Tetrapyrrolbiosynthese und Photosynthese involviert sind, Aufschluss darüber geben, ob sich eine verstärkte AtLCAA-Expression regulativ auf die Proteinebene auswirkt. In der Tat belegten die Western-Blot-Analysen, dass acht der elf getesteten Proteine bezüglich ihrer Abundanz in den Überexpressions-Linien genau diametral zu den jeweiligen Proteinlevel der Cosuppressor-Linien akkumulierten bzw. sich reduzierten (Abbildung 40A). So zeigten sich die Gehalte an GluTR, GUN4, NTRC und LIL3.1 in den Überexpressoren verringert im Vergleich zu den Cosuppressoren und überdies deutlicher dezimiert relativ zu den Kontrollen. Die regulatorische Einflussnahme auf den metabolischen Fluss innerhalb der Tetrapyrrolbiosynthese infolge einer unterstützten Intermediat-Weiterleitung durch GUN4 und LIL3 sowie der potenzielle Schutz vor oxidativem Stress durch NTRC scheinen womöglich in den Überexpressoren weniger erforderlich zu sein. Im Weiteren führte die AtLCAA-Überexpression zu erhöhten Mengen an FLU, CHL27, POR und LHCA1, während CHL27, LHCA1 und LHCB1 drastisch in den cosupprimierten Pflanzen reduziert waren. Das photoprotektive PSBS-Protein des Photosystems II akkumulierte in den AtLCAA-

überexprimierenden Linien etwas stärker gegenüber den Kontrollen. Eine Stabilisierung der Cyclase-Untereinheit CHL27 und der LHCs durch AtLCAA wäre also durchaus denkbar.



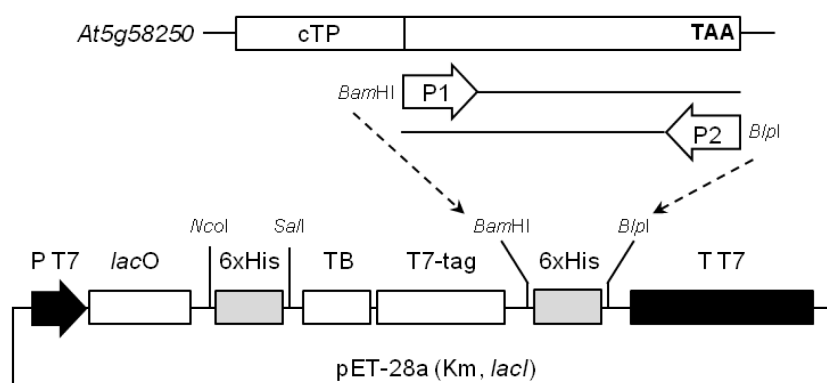
**Abbildung 40:** Analyse der Cosuppressions- und Überexpressions-Linien von *Arabidopsis* nach AtLCAA-HA-Strep-Expression in Hinblick auf die Abundanz wichtiger Proteine und die Aktivität des ratenlimitierenden Schritts der Tetrapyrrolbiosynthese. Die Ergebnisse erzeugte Josephine Herbst im Rahmen ihrer unter meiner Betreuung durchgeführten Masterarbeit. (A) Gleiche Proteinmengen von Gesamtproteinextrakten aus Blättern je einer Pflanze von Wildtyp Col-0, drei Kontroll-Linien (K1 bis K3; mit dem leeren Vektor pXCS-HA-Strep transformiert), drei cosupprimierten und drei AtLCAA-überexprimierenden Linien wurden beladen und immunologisch analysiert. Spezifische polyklonale Antikörper, die gegen tetrapyrrolbiosynthese- und photosyntheserelevante Proteine gerichtet sind, wurden eingesetzt. Für GUN4, CHL27, POR, NTRC, LIL3.1 sowie LHCA1 und LHCB1 wurden gegensätzliche Proteinakkumulationen in den Cosuppressoren gegenüber den Überexpressoren detektiert. (B) Die Messung der ALA-Syntheserate zeigt relativ zu den Kontrollen Tendenzen einer erhöhten Aktivität in den cosupprimierten Pflanzen (Cosuppr.) gegenüber unveränderten bis z. T. verringerten Raten in den Überexpressor-Linien auf.

Wenn auch die Ergebnisse der ALA-Syntheseraten von den Pflanzen der zweiten Generation allgemein divergieren, so sind doch anhand der Abbildung 40B Tendenzen veränderter Aktivitäten nach reprimierter oder erhöhter AtLCAA-Expression ersichtlich. So wiesen die cosupprimierten Linien in Korrelation zu der detektierten Steigerung des GluTR-Proteinlevels gegenüber dem Wildtyp und der Kontrolle K2 eine rund 50 %- bis 100 %ige Steigerung der ALA-Synthesekapazität auf. Demgegenüber konnte zumindest für die Überexpressor-Linie #148 entsprechend der verminderten GluTR-Proteingehalte eine Reduktion der ALA-Syntheserate nachgewiesen werden. Für die zwei weiteren Überexpressor-Linien war

entgegen den Erwartungen eine zu den Kontrollen ähnlich hohe ALA-Synthesekapazität detektierbar.

### 3.4.6 Überexpression und Reinigung von rekombinantem AtLCAA zur Durchführung von Pulldown-Experimenten

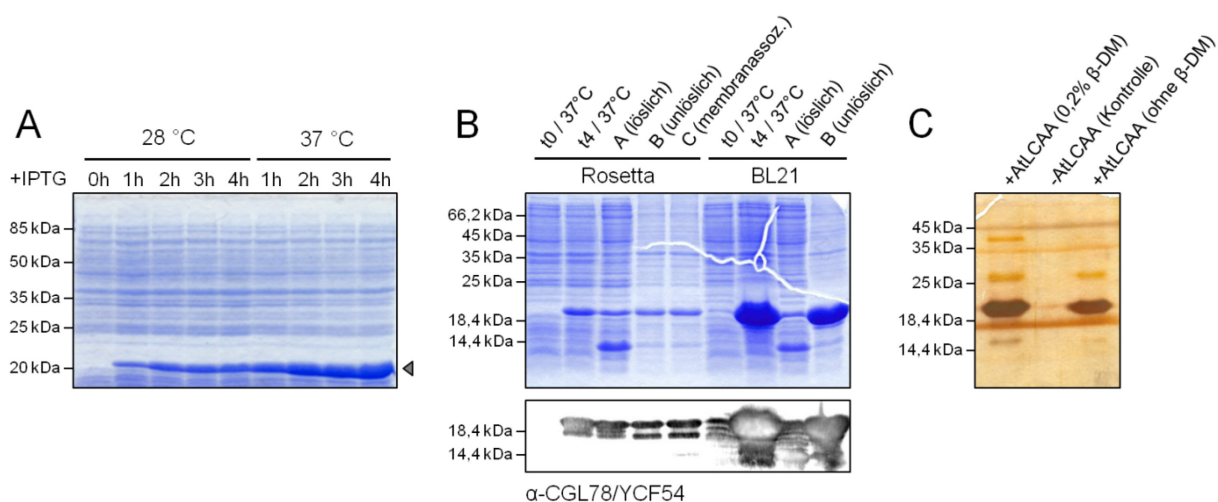
Die Expression des AtLCAA-HA-Strep-Fusionsproteins in *Arabidopsis* zielte neben der physiologischen Analyse der entsprechenden Überexpressor-Linien auch auf eine Identifikation potenzieller Interaktionspartner von AtLCAA *in planta* ab. Hierzu sind allerdings größere Mengen an Pflanzenmaterial für Co-Immunopräzipitationen erforderlich, sodass diese Untersuchungen für die Pflanzen der dritten Generation ausstehen. Daher wurde in parallelen Experimenten AtLCAA rekombinant in *E. coli* zur Durchführung von Pulldown-Versuchen exprimiert. Die 435 bp umfassende kodierende Sequenz von *AT5G58250* ohne Chloroplastentransitpeptid wurde amplifiziert und gemäß dem Schema aus Abbildung 41 in den Expressionsvektor pET-28a kloniert. Die IPTG-induzierte Expression wurde im zeitlichen Verlauf über vier Stunden in den *E. coli*-Zellen, die mit dem finalen Konstrukt transformiert wurden, überprüft. Wie sich herausstellte, konnte das N-terminal 6xHis-getaggte AtLCAA-Protein optimal in *E. coli* bei 37 °C Kultivierungstemperatur exprimiert werden (Abbildung 42A). An dieser Stelle sei angemerkt, dass eine C-terminale Fusion des AtLCAA-Proteins mit dem 6xHis-tag zu keiner erfolgreichen Überexpression führte (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 41:** Schematische Darstellung des Konstrukts zur Überexpression des N-terminal 6xHis-getaggten AtLCAA-Proteins in *E. coli*. Die kodierende Region ohne das chloroplastidäre Transitpeptid (cTP) von *AT5G58250* inklusive des Stop-Basentriplets wurde aus *Arabidopsis* cDNA mit den Primern AtLCAA\_oTP\_BamHI\_fw (P1) und AtLCAA\_oTP+Stop\_BlnI\_rev (P2) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BamHI und BlnI in den Vektor pET-28a kloniert. P T7 = T7-Promotor, lacO = lac-Operator, 6xHis = kodierende Sequenz für einen 6xHis-tag, TB = Thrombin-Schnittstelle, T7-tag = kodierende Sequenz für einen T7-tag, T T7 = T7-Terminator. Die Kanamycin-Resistenzkassette (Km) und das *lacI*-Gen befinden sich auf dem Vektorrückgrat.

Obgleich ein Großteil des rekombinant exprimierten 6xHis-AtLCAA-Fusionsproteins in der unlöslichen bzw. membranassoziierten Fraktion vorzufinden war, konnte auch ein Anteil in der löslichen Fraktion detektiert werden (Abbildung 42B). Der Einsatz größerer Kulturvolumina ermöglichte unter nativen Bedingungen die Aufreinigung des rekombinanten 6xHis-AtLCAA-Fusionsproteins, welches in nachfolgenden Pulldown-Versuchen eingesetzt wurde.

In Vorversuchen wurden die eluierten Proteine der Pulldown-Experimente in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt. Der vielversprechende Nachweis zusätzlicher Proteinbanden in den Eluaten von Pulldown-Experimenten mit dem nativ aufgereinigten 6xHis-AtLCAA-Fusionsprotein im Vergleich zur Kontrolle, also der ungebundenen Ni-NTA-Affinitätsmatrix, legte die Vermutung präsender Interaktionspartner nahe (Abbildung 42C).



**Abbildung 42:** Expression und Aufreinigung des rekombinant in *E. coli* exprimierten 6xHis-AtLCAA-Proteins zur Durchführung von Pulldown-Experimenten. (A) Das mit Hexahistidin N-terminal getaggte AtLCAA-Protein wurde optimal bei 37 °C im *E. coli*-Stamm Rosetta<sup>TM</sup> (DE3) exprimiert. Die Expression wurde stündlich ab dem Zeitpunkt vor der Induktion bis 4 Stunden nach der Induktion mit 0,5 mM IPTG verfolgt und nach SDS-PAGE per Coomassie-Färbung dokumentiert. Der graue Pfeil kennzeichnet die vorausberechnete molekulare Größe des 6xHis-AtLCAA-Fusionsproteins (20,1 kDa). (B, oben) Die Untersuchung zur Löslichkeit des rekombinant in den *E. coli*-Stämmen Rosetta<sup>TM</sup> (DE3) und BL21 (DE3) exprimierten 6xHis-AtLCAA belegte einen gewissen Anteil des Proteins in der löslichen Fraktion A. (B, unten) Die korrespondierende Western-Blot-Analyse unter Verwendung des Primärantikörpers anti-CGL78/YCF54 lieferte den immunologischen Nachweis der im obigen Coomassie-Gel akkumulierten 6xHis-AtLCAA-Fusionsproteine, aber auch einiger Abbauprodukte. (C) Die Silberfärbung der im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennten Eluate von Pulldown-Experimenten mit dem nativ aufgereinigten 6xHis-AtLCAA-Fusionsprotein lässt neben dem „Köder“-Protein im Vergleich zur Kontrolle noch weitere Proteinbanden erkennen. Lysierte und mit oder ohne 0,2 % β-DM solubilisierte Chloroplasten von *Arabidopsis* Wildtyp wurden in den 6xHis-Pulldowns als „Beute“ eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ungebundene (-AtLCAA) Ni-NTA-Agarose.

Infolgedessen wurden die Eluate von insgesamt drei unabhängigen *in vitro*-Bindungsstudien in Zusammenarbeit mit Dr. Sascha Rexroth und Nicole Plohnke (Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen; Medizinisches Proteom-Center; Ruhr-Universität Bochum) massenspektrometrisch analysiert (Teil der Masterarbeit von Josephine Herbst (2014)). Die Tabelle 28 listet alle gemeinsam in den tryptisch verdauten Eluaten der Pulldown-Experimente identifizierten Proteine, die abgesehen von einer Ausnahme nicht in den Negativkontrollen, die die ungebundene Ni-NTA-Agarose bzw. AtRIBA1 (AT5G64300) als „Köder“ enthielten, auftraten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation, die eine physikalische Interaktion von Tabak LCAA und CHL27 zeigten (Albus *et al.*, 2012), wurden ebenfalls massenspektrometrisch Peptide der Cyclase-Untereinheit CHL27 in allen Eluaten der 6xHis-AtLCAA-Pulldown-Versuche mit lysierten und solubilisierten Chloroplasten aus *Arabidopsis* identifiziert (Tabelle 28). Zudem waren drei weitere Proteine signifikant abundant, Geranylgeranyl-Reduktase, PORB und PORC, die zusammen mit CHL27 den bereits durch Kauss *et al.* (2012) beschriebenen chloroplastidären, FLU-kontrollierten Membrankomplex bilden, der demnach auch AtLCAA zu beinhalten scheint. In dem Kontroll-Eluat der im dritten Pulldown eingesetzten 6xHis-AtRIBA1-immobilisierten Matrix wurden auch Peptide der Geranylgeranyl-Reduktase gefunden. Jedoch wies die entsprechende 6xHis-AtLCAA-Probe gegenüber dieser Kontrolle für die Geranylgeranyl-Reduktase einen vierfach erhöhten Wert für die Peptid-Spektrum-Übereinstimmung (PSM) bzw. den Quotienten von PSM zur Anzahl der Aminosäuren auf. Demzufolge kann der Nachweis der Geranylgeranyl-Reduktase auch für den dritten Pulldown als wahrscheinlich angesehen werden. FLU wurde wiederum in keinem der drei Pulldown-Eluate nachgewiesen, sodass AtLCAA mit dem Komplex höchstwahrscheinlich über CHL27 oder POR interagiert. Bemerkenswerterweise wurde auch die Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR), ein Protein des photosynthetischen Elektronentransports, von der 6xHis-AtLCAA-immobilisierten Affinitätsmatrix eluiert. Dazu korrespondierend wurde ebenfalls das Thylakoid Rhodanese-ähnliche Protein (TROL) identifiziert, welches für die Verankerung der FNR in die Thylakoidmembran und zur Aufrechterhaltung eines effizienten linearen Elektronentransports erforderlich ist (Juric *et al.*, 2009). Es ist erstaunlich, dass mit sieben von den zehn identifizierten Proteinen vornehmlich solche plastidären Kandidaten nachgewiesen wurden, die NADP bzw. NADPH als Ligand binden. Neben der Geranylgeranyl-Reduktase, FNR, Cyclase und POR zählen auch die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Isoform 2, ein Enzym des Calvin-Benson-Zyklus, sowie das *AT4G35250*-Genprodukt HIGH CHLOROPHYLL FLUORESCENCE PHENOTYPE 244 (HCF244) dazu. Das Protein

HCF244 gehört zur Superfamilie der NAD(P)-bindenden Rossmann-Faltung und ist in die Translationsinitiation des essenziellen D1-Proteins des Reaktionszentrums vom Photosystem II involviert (Link *et al.*, 2012). Es ist also denkbar, dass AtLCAA sowohl mit dem FLU-kontrollierten Membrankomplex interagiert als auch eine Rolle in einem zur Stroma-Seite gerichteten, subplastidären Thylakoid-Proteinkomplex spielt, der einen entscheidenden Reduktionsäquivalente-Pool für die Photosynthese bereitstellt.

**Tabelle 28:** Identifizierte Proteine in Eluaten von 6xHis-AtLCAA-Pulldown-Experimenten mittels LC-MS/MS und Datenbanksuche. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Pulldown-Assays sind aufgeführt, die Josephine Herbst im Rahmen ihrer unter meiner Betreuung durchgeführten Masterarbeit erzeugte. Redundante Peptide für AT5G58250 wurden in den Analysen exkludiert. (PSM) engl. für Peptid-Spektrum-Übereinstimmung.

Protein	UniProt ID	Score	Abdeckung [%]	Anzahl Peptide	PSM
Geranylgeranyl-Reduktase	Q9CA67	67,6/15,8/40,2*	25,9/10,3/22,5*	9/4/8*	27/5/16*
Ferredoxin-NADP-Reduktase	Q9FKW6	64,4/29,6/10,4	38,1/14,4/12,8	10/4/3	27/10/4
Protochlid-Reduktase B (PORB)	P21218	46,0/9,6/14,1	22,9/4,7/6,7	9/2/3	22/5/6
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Isoform 2	Q9LPW0-2	45,1/75,5/21,7	29,4/28,9/23,1	8/7/6	13/26/6
MgProtoME oxidative Cyclase (CHL27)	Q9M591 F4J0U9	41,6/7,3/24,3	27,3/5,9/30,7	10/2/9	16/3/13
Thylakoid Rhodanese-ähnliches Protein	Q9M158	11,1/7,4/25,7	12,2/4,7/15,7	5/2/6	8/4/10
Protochlid-Reduktase C (PORC)	F4I2F8	27,6/9,2/16,1	21,1/7,5/16,5	7/3/5	15/5/7
Thylakoid-Membran-Phosphoprotein	Q8LCA1	19,8/14,8/13,6	20,1/14,4/20,1	2/1/2	7/4/4
AT4G35250/ HIGH CHLOROPHYLL FLUORESCENCE PHENOTYPE 244	O65502	23,8/2,7/23,7	11,7/6,3/16,5	4/2/6	10/2/11
AT4G32260/ PIGMENT DEFECTIVE 334	Q42139	16,1/3,6/11,6	21,5/4,1/23,3	3/1/4	8/2/6

\* Quotient von PSM zur Anzahl der Aminosäuren ist um den Faktor 4 relativ zur Kontrolle erhöht



## 4 Diskussion

### 4.1 Das Wechselspiel zwischen zeitlich induzierbarer Deaktivierung von chlorophyllbiosyntheserelevanten Genen und tetrapyrrolvermittelter Signalgebung

Biosynthese, Akkumulation und der Abbau von Tetrapyrrolen sind höchstwahrscheinlich mit der Chloroplastenentwicklung, Photomorphogenese und der Signalgebung zwischen Plastiden und dem Zellkern assoziiert. Experimentelle Analysen lieferten Belege, dass neben multiplen plastidenlokalisierten Metaboliten und Regulationsmechanismen Mg-Porphyrine als retrograde Signale diskutiert werden können (Strand *et al.*, 2003). Im Bestreben unser Verständnis hinsichtlich tetrapyrrolvermittelter Signalgebung zu erweitern, wurden in dieser Arbeit Versuche zur Auswirkung einer kurzzeitig modifizierten Tetrapyrrolbiosynthese auf die nukleäre Genexpression durchgeführt. Posttranskriptionelles Gen-„Silencing“, eine auf sequenzspezifischem RNA-Abbau basierende Methode, hat sich in der reversen Genetik bewährt, um die Expression von Zielgenen zu reduzieren (Watson *et al.*, 2005). Die Technik des Virus-induzierten Gen-„Silencings“ bietet hierbei eine schnelle, alternative Methode für die Stilllegung pflanzlicher Genexpression ohne eine erforderliche Generierung transgener Pflanzen (Ruiz *et al.*, 1998; Baulcombe, 1999; Dinesh-Kumar *et al.*, 2003). Allerdings ließen Einschränkungen in der Anwendbarkeit, wie z.B. eine instabile Effizienz (Avesani *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011), das gewebespezifische „Silencing“ innerhalb adulter Pflanzenblätter und die noch unzureichende Etablierung für *Arabidopsis*, diese Methode als ungeeignet erscheinen. Aufgrund des vorteilhaften Aspekts einer regulierbaren, präzisen, zeitlichen Kontrolle der Inaktivierung des Zielgens fiel die Methode der Wahl auf chemisch induzierbare Systeme. Einflüsse durch andere Signale, wie ROS oder photosynthetische Redox-Kontrolle konnten vernachlässigt werden. Folglich wurde das Dexamethason-induzierbare pOpOff2-Vektorsystem (Wielopolska *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006) herangezogen, um eine kurzzeitige Deaktivierung von *AtCHLH* und *AtCHL27* zu erzielen. Die Gene *CHLH* und *CHL27* wurden speziell ausgewählt, da sie für die Schrittmacherenzymsschritte der Tetrapyrrolbiosynthese kodieren, bei denen die entscheidenden Mg-Porphyrine synthetisiert, bzw. umgewandelt werden (s. Abschnitt 1.2.3 und Abbildung 3, S. 7).

Über längere Zeiträume der Dexamethason-Applikation wurden Ausbleicheeffekte und Nekrosen als Reaktion der *CHLH*- und *CHL27*-Gendeaktivierung in den Blättern beobachtet

(Abbildung 8B, S. 69; Abbildung 10C, S. 71) sowie verminderte Porphyrin- und Chlorophyllgehalte detektiert (Abbildung 7A-C, S. 67; Schlicke *et al.* (2014)). Wiederum kann anhand erster Pigmentquantifizierungen (Abbildung 7C, S. 67) rückgeschlossen werden, dass während der frühen Phase der RNAi-Gendeaktivierung sowohl die Photosynthese als auch andere physiologische Prozesse innerhalb der Plastiden unbeeinträchtigt blieben. Phänotypische Analysen der RNAi-Pflanzenkeimlinge und die Detektion ihrer Chlorophyllgehalte nach 24-stündiger Dexamethason-Behandlung unterstützen den Rückschluss (Schlicke *et al.*, 2014).

Analysen mittels qPCR zeigten 24 h nach Dexamethason-Behandlung keine signifikanten Veränderungen in den Expressionen der untersuchten tetrapyrrol- und photosynthese-relevanten, kernkodierten Genen (Abbildung 7D, S. 67; Schlicke *et al.* (2014)). Dennoch kann angenommen werden, dass die kurzfristig verminderten *CHLH*- und *CHL27*-Expressionen zu einer Störung in der Assemblierung des jeweiligen Enzymkomplexes führten. Denn als Ergebnis von verminderten Enzymaktivitäten (Schlicke *et al.*, 2014) waren vorübergehende Veränderungen der Steady-State-Gehalte an MgProto und MgProtoME zu verzeichnen (Abbildung 7A-B, S. 67; Schlicke *et al.* (2014)).

Weiterführende Transkriptomanalysen mithilfe des Microarray-Verfahren lieferten für die kurzzeitige Gendeaktivierung von *CHLH*, *CHLM* und *CHL27* 206, 188 bzw. 206 hoch- oder herunterregulierte Gene (Schlicke *et al.*, 2014). Die Analyse ebensolcher früh deregulierten Gene als Antwort auf Expressionsveränderungen von Tetrapyrrolbiosynthesegenen sollte ihre Rolle als mögliche Kandidaten für tetrapyrrolvermittelte retrograde Signalgebung aufschlüsseln. Wie ein Vergleich mit der Luciferase-RNAi-Kontroll-Linie zeigte, bestätigten sich jedoch potenzielle Sekundäreffekte des RNAi-Systems (Huang *et al.*, 2011), sodass die meisten Gene als Reaktion des induzierbaren Vektorsystems dereguliert waren. Trotz der vorangegangenen Überlegungen zu dem geeigneten System weist folglich das gewählte Dexamethason-induzierbare pOpOff2-Vektorsystem Limitationen auf.

#### **4.2 Photoautotrophe Zellkulturen von *Arabidopsis* als ergänzendes experimentelles System**

Erst im Laufe der letzten Jahre wurden photoautotrophe Zellsuspensionskulturen (PASK) von *Arabidopsis* generiert und etabliert. Das Wachstum ohne jegliche zugefügte Kohlenstoffquelle

war lange Zeit nicht möglich und keine oder nur sehr schwache Photosyntheseaktivitäten waren detektierbar (Christie & Jenkins, 1996). Eine Vielzahl an Suspensionskulturen konnten bereits den Erfolg bzgl. der Untersuchung unterschiedlicher Fragestellungen zu Abwehrreaktionen, der Bildung von Sekundärmetaboliten, Ionentransport, Genregulation und Signaltransduktion aufzeigen (als Review s. Roitsch & Sinha (2002)). Der entscheidende Vorteil der PASK besteht in ihrer uniformen Zellpopulation, deren Zellen gleichzeitig Effektoren ausgesetzt werden können. Nachteilig wirkt sich dagegen ihre langsame Entwicklung und Zellteilung aus, mit Verdopplungszeiten von 1,5-3 Tagen (Roitsch & Sinha, 2002). In der Regel ist der Chlorophyllgehalt von PASK im Vergleich zu dem grüner Blätter geringer. Zwar ist der Gesamtchlorophyllgehalt pro Chloroplast ähnlich, jedoch variiert die Anzahl der Chloroplasten in den PASK-Zellen und bedingt so vermutlich den geringeren Chlorophyllgehalt (Roitsch & Sinha, 2002). Mithilfe der Lichtfluoreszenzmikroskopie wurde bestätigt, dass PASK von *Arabidopsis* kleine Aggregate von Zellen variierender Chloroplastenanzahl bilden. Zudem konnte die Intaktheit sowie strukturelle Integrität der *Arabidopsis* PASK-Zellen und der enthaltenen Chloroplasten per ultrastrukturellen Analysen mit dem Transmissionselektronenmikroskop verifiziert werden (Hampp *et al.*, 2012).

Die Anwendbarkeit der PASK für Studien schneller Signalantworten wurde mithilfe der in dieser Arbeit unter Abschnitt 3.2 beschriebenen Experimente zur Applizierung von Chlorophyllintermediaten (z.B. ALA, Proto, MgProto), Häm und verschiedener Inhibitoren der Tetrapyrrolbiosynthese (Acifluorfen, 2,2'-Dipyridyl, Gabaculin) bestätigt. Als Konsequenz dieser Fütterungsexperimente konnte die Dysregulation oder Inaktivierung des Tetrapyrrolbiosyntheseweges binnen weniger Stunden aufgezeigt werden. Für die MgProto- und 2,2'-Dipyridyl-Applikation war bereits nach zwei Stunden ein sehr starker Effekt auf die *steady-state*-Gehalte von Proto, MgProto und MgProtoME in den PASK zu beobachten (Tabelle 20, S. 77). Bereits Granick (1959) zeigte, dass ALA-Fütterungen Akkumulationen von Chlorophyllintermediaten hervorrufen, die sich auch für die PASK, am eindrucksvollsten anhand der 140-fachen Proto-Anreicherung, bestätigen ließen (Abbildung 13, S. 75). Darüber hinaus korrelieren die erhöhten Chlorophyllgehalte ALA-gefütterter PASK mit den beobachteten, positiven Effekten einer ALA-Applikation auf die Chlorophyllakkumulation im Licht bei Angiospermen (Al-Thabet, 2006; Awad, 2008; Memon *et al.*, 2009). Signifikante Veränderungen der Transkriptabundanzen von Genen, die für plastidenlokalisierte Proteine der Chlorophyll- und Photosynthese kodieren, konnten infolge der Fütterungsexperimente detektiert werden. Pflanzen vermögen nicht MgProto oder MgProtoME aufzunehmen,

dennoch können unter Verwendung des Hemmstoffes Thujaplicin Störungen der endogenen Mg-Porphyrinlevel hervorgerufen werden. Thujaplicin hemmt die Protochlid-Synthese, infolgedessen es zur Akkumulation von MgProto und MgProtoME kommt. In diesen Vergleichsstudien konnte gezeigt werden, dass sowohl Thujaplicin- als auch 2,2'-Dipyridyl-Behandlungen zu einer Reduktion im *LHCB*-Transkriptgehalt führen (Oster *et al.*, 1996). Wenn auch die Effekte der sechsständigen MgProto- und 2,2'-Dipyridyl-Behandlung auf die Expression von *LHCB1.2* nicht sehr deutlich waren, so zeigten sich eindrucksvolle Expressionsveränderungen für Gene, die für die GluTR, Fe-Chelatase, GUN4, Chlorophyll *a*-Oxygenase und die zytosolische Ascorbat-Peroxidase kodieren (Abbildung 14, S. 76). Der negative Effekt von Tetrapyrrolen auf die Expression der sogenannten Photosynthese-assoziierten nukleären Gene (PhANG) wurde in zahlreichen Arbeiten verifiziert (Strand *et al.*, 2003; Bang *et al.*, 2008; Kindgren *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Kindgren *et al.*, 2012). Ebenfalls können die detektierten *LHCB1.2*-Transkriptreduktionen der ALA-applizierten PASK (Abbildung 13, S. 75) durch frühere ALA-Fütterungsexperimente bestätigt werden (Kittsteiner *et al.*, 1991; Vinti *et al.*, 2000). PASK ermöglichen reproduzierbare Analysen von kurzzeitig induzierten Signalprozessen. Bestätigt durch die unmittelbare Aufnahme des Hemmstoffes Acifluorfen, die bereits 15 Minuten nach Applikation in einer massiven Proto-Akkumulation deutlich wird (Hampp *et al.*, 2012), stellen PASK ein innovatives Werkzeug für die schnelle Manipulation und Analyse von physiologischen Vorgängen dar. Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass PASK den Einsatz und Nutzen von *Arabidopsis* als Modellpflanze ergänzen und vor allem zeitaufgelöste Experimente bzgl. der schnellen Regulation des Tetrapyrrolmetabolismus und primärer Antworten auf externe Stimuli und metabolische Signale ermöglichen. Bislang sind keine Transformationen von PASK-Zellkernen oder -Chloroplasten beschrieben, infolgedessen Korrelationen zu transgenen Pflanzen noch eingeschränkt möglich sind. Allerdings werden Erfolge in diesem Bereich das Feld für zukünftige Arbeiten und Analysen immens erweitern.

### 4.3 Erkenntnisse zu tetrapyrrolvermittelten retrograden Signalen

Anhand der gewonnenen Microarray-Daten scheint eine 24-stündige Deaktivierung der ersten drei enzymatischen Schritte des Mg-Zweiges der Chlorophyllbiosynthese voraussichtlich keine Gene anzusprechen, die für eine Plastiden-Kern-Kommunikation erforderlich sind. Durch die Gendeaktivierungen von *CHLH*, *CHLM* und *CHL27* konnten keine frühzeitigen

Effekte auf die Kerngenexpression aufgezeigt werden, obwohl die korrespondierenden Enzymaktivitäten nachweislich vermindert waren (Schlicke *et al.*, 2014). Ungeachtet dessen bieten die Arbeiten zur langzeitigen Deaktivierung von *CHLH*, *CHLM* und *CHL27* einen Ausblick auf eine vielschichtige Beteiligung der Tetrapyrrolbiosynthese an der nukleären Genexpression infolge  $^1\text{O}_2$ -induzierter Signalkaskaden und Feedback-regulierter ALA-Synthese (Schlicke *et al.*, 2014). Demzufolge vermögen frühzeitige Dysregulationen innerhalb der Tetrapyrrolbiosynthese keine retrograden Signale zu bilden, solange kein oxidativer Stress oder photodynamische Auswirkungen der akkumulierenden Intermediate bestehen. Erst mittelbare Auswirkung traten vier Tage nach kontinuierlicher Dexamethason-Zufuhr in Erscheinung. Zwei Phänotypen ließen sich aufgrund der Langzeitdeaktivierung unterscheiden, die mit den Beobachtungen aus Abbildung 10C (Seite 71) korrelieren, ein blassgrüner Phänotyp für die *CHLH*- und *CHLM*-RNAi-Linie sowie Blattnekrosen bei der *CHL27*-RNAi-Linie. Korrespondierend zu den verschiedenartigen Phänotypen ergaben sich für die jeweiligen, analysierten Gene, darunter Stellvertreter für PhANGs, tetrapyrrolbiosynthese-relevante Gene und ROS-Markergene, keine einheitlichen Kinetiken, sondern individuelle Regulationen der Transkriptakkumulationen (Schlicke *et al.*, 2014). Die Genexpressionsanalysen lassen vermuten, dass eine MgProtoME-Akkumulation infolge der *CHL27*-Gendeaktivierung zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führt, wodurch ROS-Markergene, wie das  $^1\text{O}_2$ -responsive Gen *BONZAI1-ASSOCIATED PROTEIN (BAP1)* (op den Camp *et al.*, 2003), induziert und Tetrapyrrolbiosynthese-Gene sowie PhANGs supprimiert werden. Interessanterweise war keines der analysierten ROS-responsiven Gene in den über vier Tage induzierten *CHLH*- und *CHLM*-RNAi-Linien stärker exprimiert. Diese RNAi-Linien gleichen vielmehr den Tabak *CHLH*- bzw. *CHLM*-Antisense-Pflanzen (Papenbrock *et al.*, 2000a; Alawady & Grimm, 2005). Veränderungen der Kengenexpression infolge einer *CHLH*- oder *CHLM*-Gendeaktivierung korrelieren demnach mit dem reduzierten Chlorophyllgehalt und einem verminderten metabolischen Fluss innerhalb des Tetrapyrrolbiosyntheseweges. Zwei unabhängige Transkriptomanalysen zur *gun4-1-knock-down*-Mutante und von Gabaculin-behandelten *Arabidopsis*-Keimlingen (Czarnecki *et al.*, 2012) lieferten im Vergleich zu den langfristig induzierten *CHLH*- und *CHLM*-RNAi-Linien ein übereinstimmendes Set an deregulierten Genen. Zukünftige Studien sind erforderlich, um die von der ALA-Synthese stammenden multiplen retrograden Signale nachzuweisen und die Verflechtung unterschiedlicher retrograder Signalwege zu entschlüsseln.

Anhand der Daten zu porphyringefütterten PASK lassen sich zusammengefasst mit den Resultaten zu den RNAi-Linien keine Hinweise darauf finden, dass Tetrapyrrolintermediate unmittelbar Auslöser retrograder Signale sind. MgProto als Plastidensignal bleibt weiterhin sehr spekulativ. So weist die *CHLH*-RNAi-Linie MgProto-Reduktionen auf, während die *CHLM*-RNAi-Linie MgProto akkumuliert und dennoch zeichnen sich beide Linien durch ein ähnliches Set an deregulierten Genen aus (Schlicke *et al.*, 2014). Transkriptanalysen von MgProto-applizierten PASK verdeutlichen zwar, dass PhANGs in ihren Expressionen verringert werden, aber gleichermaßen auch deutlich gesteigerte Expressionen für die zytosolische Ascorbat-Peroxidase zu verzeichnen waren (Abbildung 14C, S. 76). Dies erhärtet wiederum die Vermutung über eine eng miteinander verbundene Verflechtung zur ROS-vermittelten Expressionsregulation. Schlussendlich scheint eher die Deregulation des jeweiligen Enzymschrittes für die Signalgebung verantwortlich zu sein als das Tetrapyrrolintermediat selbst, wenn auch dies vorerst noch hypothetisch bleibt.

#### **4.4 Phylogenetische Betrachtungen und die partielle knockdown-Mutation von *ycf54* weisen auf eine essenzielle Funktion von LCAA/Ycf54 in der Chlorophyllbiosynthese hin**

Die Identifizierung und Charakterisierung essenzieller Proteine unbekannter Funktion ist speziell in höheren Pflanzen erschwert, da Knockout-Mutationen häufig letal sind und nicht durch ein Wachstum unter mixotrophen Bedingungen gerettet werden können. Lein *et al.* (2008) ermöglichten durch die Verwendung einer normalisierten cDNA-Bibliothek aus Tabak die Generierung einer umfassenden Kollektion an Tabak-Antisense-Pflanzen. Obgleich ein Antisense-Effekt in der Regel weniger drastisch ausfällt als eine Gendeaktivierung mittels RNAi, so konnten doch bereits einige unbekannte Proteine durch diesen Screen identifiziert und charakterisiert werden (Lein *et al.*, 2008; Albus *et al.*, 2010; Arsova *et al.*, 2010).

Die Tabak *LCAA*-Antisense-Pflanzen zeichnen sich durch einen reduzierten Chlorophyllgehalt und ein deutlich erhöhtes Chlorophyll *a/b*-Verhältnis aus (Abbildung 31, S. 102). Anfänglich glichen daher die *LCAA*-Antisense-Pflanzen phänotypisch solchen Mutanten, die einen Defekt in der LHC-Biogenese oder der cpSRP-cpFtsY-Alb3-abhängigen Thylakoidmembran-Insertion aufweisen (Klimyuk *et al.*, 1999; Hutin *et al.*, 2002). Aber es bestehen auch Ähnlichkeiten zu Mutanten mit einer beeinträchtigten Chlorophyll-, vor allem einer Chlorophyll *b*-Synthese (Tanaka & Tanaka, 2011).

Die phylogenetische Verteilung von *LCAA/Ycf54* (Abbildung 17, S. 81; Abbildung 28, S. 99) spricht deutlich für eine generelle Rolle in der Chlorophyllbiosynthese. So ist das *LCAA/Ycf54*-Gen, abgesehen von Grünalgen, Moosen und höheren Pflanzen, auch in den meisten Cyanobakterien und Rhodophyta konserviert, die wiederum keine LHC-Antennenproteine besitzen. Demnach scheint eine ausschließliche Funktion von *LCAA/Ycf54* in der LHC-Biogenese weniger wahrscheinlich. *Ycf54* ist damit der dritte cyanobakterielle Vertreter der *ycf*-Familie, der für ein Protein kodiert, das seine Funktion in der Chlorophyllbiosynthese der Cyanobakterien zu haben scheint. *LCAA* wird nachweislich in die Chloroplasten importiert, wie GFP-Fusionen neben den *in silico*-Vorhersagungen bestätigten (Abbildung 29, S. 100; Albus *et al.* (2012)). Orthologe Gene von *LCAA* sind in verschiedenen Algenarten im Chloroplastengenom lokalisiert (Abbildung 28, S. 99). Interessanterweise besitzen sechs *Prochlorococcus*-Arten, die an eine Umwelt mit deutlich erniedrigten Lichtbedingungen adaptiert sind, keine *LCAA*-Homologe (Castruita *et al.*, 2011). Western-Blot-Analysen der *LCAA*-Antisense-Pflanzen zeigen, dass nicht alle LHC-Proteine in ihrer Abundanz beeinträchtigt sind (Albus *et al.*, 2012), sodass keine generelle Rolle von *LCAA* in der Biogenese von LHC-Apoproteinen anzunehmen ist.

In Cyanobakterien kann dem *Ycf54*-Protein eine bedeutungsvolle Funktion beigemessen werden, da trotz verschiedenster aerober Anzuchten, die getestet wurden, keine vollständig segregierte *ycf54*-defiziente Linie selektiert werden konnte (Abbildung 16B, S. 80). Unter Schwachlichtbedingungen wächst die *ycf54*-Mutante noch am besten (Abbildung 18A, S. 82). Mutanten von *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit einer vollständigen Gendeletion für Proteine der Photosynthesekomplexe sind durch die zusätzliche Bereitstellung von Zucker imstande zu wachsen (Shen & Vermaas, 1994). Auch zeigte die *Synechocystis ycf53*-Mutante, dass ein vollständiger Knock-out des Genproduktes *Gun4* toleriert werden kann (Wilde *et al.*, 2004; Sobotka *et al.*, 2008). *Gun4* wirkt als regulatorisches Protein vor allem auf die Chlorophyllbiosynthese, aber ein vollständiger Verlust an *Gun4* beeinträchtigt nicht unmittelbar die Chlorophyllbiosynthese. Hingegen scheint eine komplette Substitution von Genen, die für Proteine mit einer essenziellen katalytischen Funktion in der Tetrapyrrolbiosynthese kodieren, unmöglich zu sein. So scheiterte auch der Versuch einer vollständigen Segregation von *ycf59/cycI* (Peter *et al.*, 2009). Es ist auffällig, dass nur eine gewisse Expressionsminderung sowohl an *cycI* als auch an *ycf54* in den jeweiligen Mutanten akzeptabel zu sein scheint.

#### 4.5 Physikalische Interaktionen von LCAA/Ycf54 und CHL27/CycI untermauern eine Zugehörigkeit von LCAA/Ycf54 zur Cyclase-Reaktion

Die *LCAA*-Antisense-Pflanzen zeigen zu den verringerten LHC-Proteingehalten (Abbildung 33, S. 106; Albus *et al.* (2012)) ein stark erhöhtes Chlorophyll *a/b*-Verhältnis, sodass zunächst eher eine Dysregulation eines der späteren Schritte innerhalb der Chlorophyllbiosynthese vermutet wird. Quantifizierungen von Chlorophyllintermediaten gaben hierzu die entscheidende Auskunft. Die Bestimmung der Chlorophyllintermediat-Gehalte in den *LCAA*-Antisense-Pflanzen lassen einen primären Defekt, verursacht durch eine beeinträchtigte Cyclase-Reaktion, vermuten. Dies zeigten die drastischen MgProtoME-Akkumulationen und reduzierte Protochlid-Gehalte sowohl nach ALA-Fütterung (Tabelle 25, S. 103), als auch unter *steady-state*-Bedingungen (Tabelle 26, S. 104). Bezüglich der MgProtoME-Akkumulationen ähneln die *LCAA*-Antisense-Pflanzen sehr den CHL27-defizienten *Arabidopsis*- und Tabak-Mutanten (Tottey *et al.*, 2003; Peter *et al.*, 2010), die ebenfalls einen blassgrünen Phänotyp aufweisen. Korrespondierend zu den Ergebnissen der *LCAA*-Antisense-Pflanzen akkumuliert auch die cyanobakterielle *ycf54*-knockdown-Mutante das Substrat der Cyclase. Ein Vergleich der *cycI*- und *ycf54*-Mutanten verdeutlicht, dass beide Mutanten mit 150- bzw. 60-fach erhöhten MgProtoME-Gehalten im Vergleich zum Wildtyp ähnlich drastische Akkumulationen aufweisen (Tabelle 22, S. 85; Peter *et al.* (2009)).

Für CycI und Ycf54 wurde die Lokalisierung an oder in den Thylakoidmembranen nachgewiesen (Peter *et al.*, 2009; Wallner, 2012). Die reduzierten CycI-Proteingehalte in *ycf54* (Abbildung 21, S. 86) deuten auf eine Cyclase-stabilisierende Funktion von Ycf54. Auch die Proteingehalte für CHL27 sind in den *LCAA*-Antisense-Pflanzen deutlich verringert, während ein Großteil der getesteten Enzyme der Tetrapyrrolbiosynthese in normalen oder sogar gesteigerten Mengen gegenüber dem Wildtyp akkumulierten (Abbildung 33, S. 106). Da die spezifische Verringerung der CHL27-Proteingehalte nicht mit einer verminderten *CHL27*-Transkription einherging (Abbildung 34, S. 108), kann LCAA ebenfalls eine stabilisierende Funktion für CHL27 im Cyclase-Enzymkomplex zugeschrieben werden.

In zwei parallel veröffentlichten Arbeiten verifizierten Affinitätsreinigungen von FLAG-getagtem Ycf54 direkte physikalische Interaktionen von Ycf54 mit CycI (Hollingshead *et al.*, 2012; Wallner, 2012). Für höhere Pflanzen konnte mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen LCAA und CHL27



bestätigt werden. Interessanterweise zeigten diese Ergebnisse auch eine Interaktion von LCAA mit sich selbst, sodass Homodimere oder unter Umständen auch Oligomere gebildet werden (Albus *et al.*, 2012). Die soeben genannten Interaktionsstudien stimmen sehr gut mit den massenspektrometrischen Daten dieser Arbeit überein, die für 6xHis-AtLCAA-Pulldown-Versuche identifizierte Peptide der Cyclase-Untereinheit CHL27 lieferten (Tabelle 28, S. 122). Korrespondierend dazu konnten Bollivar *et al.* (2014) mittels Ionenaustauschchromatographie der Chloroplasten-Membranfraktion aus Gerste die Koloalisation von YCF54 mit dem AcsF-Homolog XanL nachweisen. Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass die Funktion von LCAA/Ycf54 von Cyanobakterien bis zu den höheren Pflanzen stark konserviert ist.

Sequenzvergleiche ließen Rückschlüsse auf eine Ähnlichkeit von CycI/CHL27 mit dem Monooxygenase-ähnlichen Protein zu, das eine Eisenbindestelle in der katalytischen Region aufweist (Berthold & Stenmark, 2003). Weitere Untereinheiten des Monooxygenase-Proteinkomplexes zur Gewährleistung der Reduktionskraft für die katalytische Untereinheit und der Proteinassemblierung werden angenommen. Entsprechend kann LCAA/Ycf54 durch die Abwesenheit einer putativen katalytischen Domäne als Gerüstprotein, das zur Stabilität und/oder Assemblierung der Cyclase beiträgt, vorgeschlagen werden. Darüber hinaus liefern die 6xHis-AtLCAA-Pulldown-Experimente erste konkrete Hinweise zur Identität der bis dato noch nicht identifizierbaren Reduktase-Untereinheit: die FNR (Tabelle 28, S. 122). Weiterführende Untersuchungen mit den Überexpressions-Linien von *Arabidopsis* nach AtLCAA-HA-Strep-Expression bestätigten, dass FNR mit LCAA co-immunopräzipitiert (J. Herbst, persönliche Mitteilung). Demzufolge stellt FNR nicht allein die entscheidenden Reduktionsäquivalente für die Photosynthese bereit, sondern liefert höchstwahrscheinlich auch als Komponente der Cyclase im Komplex mit CHL27 und LCAA die erforderliche Reduktionskraft.

#### **4.6 Der LCAA/Ycf54-Mangel wirkt sich auf die ALA-Synthese und die Akkumulation tetrapyrrolbiosyntheserelevanter Proteine aus**

Allgemein sind ausbalancierte, regulierte Proteinlevel in der Tetrapyrrolbiosynthese für die Sicherstellung des metabolischen Flusses unabdingbar. Die cyanobakterielle *cycI*-knockdown-Mutante konnte nur eine 25 %ige Reduktion an CycI tolerieren (Peter *et al.*, 2009). Die maximale Verminderung der *ycf54*-Genexpression von 20 % in *ycf54<sup>-</sup>* (Abbildung 24, S. 92) verdeutlicht zusätzlich zur unvollständigen Segregation die limitierte Toleranz eines

Ycf54-Mangels. Folglich können in *Synechocystis* keine stärkeren Reduktionen an CycI oder Ycf54 akzeptiert werden, ohne eine unvermeidliche Schädigung durch einen Überschuss an photoreaktiven Tetrapyrrolintermediaten zu riskieren. Ferner wird infolge der stark erhöhten MgProtoME-Akkumulationen in der *ycf54*-Mutante die Bildung von ALA über einen Feedback-Mechanismus herabgesetzt (Abbildung 22, S. 87). Demnach wirkt sich Ycf54 und/oder der gesamte Zyklisierungsschritt regulatorisch auf die ALA-Synthese aus. Im Weiteren zeichnet sich die Ycf54-defiziente Mutante durch verringerte Chlorophyll- und Phycocyaningehalte aus (Abbildung 19, S. 83; Tabelle 23, S. 89). Die durchgeführten Western-Blot-Analysen belegten für *ycf54* reduzierte Proteingehalte an CycI und für die Fe-Chelatase (HemH), aber auch für Komponenten des Photosystems I (Abbildung 21, S. 86). In Cyanobakterien sind die Chlorophyllmoleküle mit den Core-Komplexen der Photosysteme und nicht mit den peripheren Antennen assoziiert. Entsprechend korreliert die Assemblierung und Funktionalität der Core-Komplexe direkt mit der Verfügbarkeit an Chlorophyll. Arbeiten zu einer cyanobakteriellen *chlL*-defizienten Mutante, die außerstande ist, lichtunabhängig Chlorophyll zu synthetisieren, gaben hierzu näheren Aufschluss. Kada *et al.* (2003) lieferten den Nachweis einer präferenziellen Abnahme der Aktivität und Proteingehalte vom Photosystem I gegenüber dem Photosystem II bei Chlorophylllimitation. Demnach werden die in dieser Arbeit dargelegten Proteindaten und 77K-Fluoreszenzspektren (Abbildung 23B, S. 90) in ihrer Aussage unterstützt, dass gegenüber dem Photosystem II eine stärkere Beeinträchtigung des Photosystems I zu verzeichnen ist. Die in den Analysen von Hollingshead *et al.* (2012) gezeigten Gehalte von Methyltransferase und Fe-Chelatase entsprechen nicht den eigenen Ergebnissen. Es ist denkbar, dass die in dieser Arbeit mithilfe einer Verdünnungsreihe detektierten marginalen Unterschiede in der HemH-Proteinabundanz der *ycf54*-Mutante gegenüber dem Wildtyp in der Analyse von Hollingshead *et al.* (2012) nicht in Erscheinung traten. Die korrelierende Abnahme der Fe-Chelatase-Aktivität bei Ycf54-Defizienz (Abbildung 22, S. 87) stützt einen verringerten HemH-Gehalt in der *ycf54*-Mutante. Die Annahme einer schwächeren Membranassoziation der Methyltransferase oder gar eines spezifischen Abbaus dieses Enzyms in der *ycf54*-Mutante kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Weder die für Mutante und Wildtyp vergleichbaren *steady-state*-Gehalte an MgProto (Tabelle 22, S. 85; Tabelle 23, S. 89) noch der korrespondierende Western-Blot der *LCAA*-Antisense-Pflanzen (Abbildung 33, S. 106) lassen eine durch einen Ycf54-Mangel bedingte Proteinabnahme der Methyltransferase vermuten. Allerdings konnte für die Tabakmutanten eine drastisch verringerte

Methyltransferase-Aktivität detektiert werden (Abbildung 32, S. 105), sodass eine Beeinträchtigung dieses Enzyms unabhängig von der Proteinabundanz naheliegt.

Der *LCAA*-Antisense-Effekt führt ebenfalls nicht allein zu verminderten CHL27-Gehalten und einer verringerten katalytischen Bildung von Protochlid, die sich in den *steady-state*-Gehalten durch eine Anreicherung von MgProtoME und einer Reduktion von Protochlid (Tabelle 26, S. 104) sowie von Chlorophyll (Abbildung 31, S. 102) äußern. Auch weitere Proteine sind in ihrer Abundanz beeinflusst (Abbildung 33, S. 106). Wie oben bereits erwähnt, sind die *LCAA*-Antisense-Linien interessanterweise durch einen relativ zu Chlorophyll *a* stärker beeinträchtigten Chlorophyll *b*-Gehalt charakterisiert. Daraus resultierend ist die Abundanz der LHC-Proteine, die mehr Chlorophyll *b* gegenüber Chlorophyll *a* binden, deutlich verringert (Abbildung 33, S. 106; Albus *et al.* (2012)). Aber auch Unterschiede in den Gehalten von Proteinen der Tetrapyrrolbiosynthese wurden in den transgenen Linien gegenüber Kontrollpflanzen deutlich. Insbesondere wurden erhöhte Gehalte für GluTR, CHLH und POR detektiert. Wie einleitend beschrieben, sind diese Proteine in wichtige regulatorische Schritte der Tetrapyrrolbiosynthese involviert und in Abhängigkeit von ALA-Syntheseraten werden deren Abundanzen reguliert. Der erhöhte Gehalt an GluTR korreliert mit erhöhten ALA-Synthesekapazitäten (Abbildung 32; S. 105). Höhere Pflanzen entwickelten eine strenge Feedback-Kontrolle zur Regulation der ALA-Synthese als Antwort auf akkumulierende Tetrapyrrole und ROS (Cornah *et al.*, 2003; Tanaka & Tanaka, 2007). Demzufolge stimuliert eine reduzierte *LCAA*-Expression in höheren Pflanzen vermutlich die ALA-Synthese aufgrund mangelnder Feedback-Kontrolle. Ebenfalls korrelieren die Proteinakkumulationen mit den erhöhten Transkriptgehalten der getesteten tetrapyrrolbiosyntheseinvolvierten Enzyme (Abbildung 34, S. 108). Allerdings ist diese Korrelation von Transkriptgehalten und entsprechender Proteinakkumulationen in Abhängigkeit von der Stärke des Antisense-Phänotyps nicht mehr für die Linie *LCAA* #4 anwendbar. Hier sind sekundäre Effekte aufgrund der drastischen Reduktion im Chlorophyllgehalt am wahrscheinlichsten. Dass die getesteten, nukleären Gene generell hochreguliert waren, könnte durch ein Fehlen negativer Signale, die im reifen Source-Gewebe durch Photoassimilate hervorgerufen werden (Koch *et al.*, 1996; Pego *et al.*, 2000), ausgelöst worden sein.

#### 4.7 Die Überexpression von LCAA/Ycf54 führt nicht allein zu einer Kompensation des Cyclase-Defektes

Durch die induzierte Expression von FLAG-Ycf54 in *Synechocystis* konnten sowohl eine vollständige Reduktion des MgProtoME-Gehaltes auf das *steady-state*-Level im Wildtyp erzielt (Tabelle 23, S. 89) als auch die zu beobachtende Abnahme der ALA-Synthesekapazität in der *ycf54*-Mutante aufgehoben werden (Abbildung 26, S. 94). Ähnliche Regulationsvorgänge zwischen späten und frühen Enzymschritten der Tetrapyrrolbiosynthese konnten ebenso in der *cycI*-Mutante vor und nach Komplementation durch Synthese von FLAG-CycI beobachtet werden (Peter *et al.*, 2009). Infolge der Komplementation von *ycf54* oder *cycI* mit den jeweiligen homologen Genprodukten war eine komplette Wiederherstellung der Zyklisierungsreaktion der Chlorophyllbiosynthese gegeben. In diesem Zusammenhang wäre es von entscheidender Relevanz, jene physikalischen Interaktionen zu identifizieren, die die Verbindung der Cyclase-Reaktion mit den Enzymen der ALA-Synthese entschlüsseln. Auch die massenspektrometrischen Analysen durch Hollingshead *et al.* (2012) gaben bislang keine Hinweise auf weitere Interaktionspartner von CycI oder Ycf54. Obwohl die Komplementation durch eine Überexpression von Ycf54-FLAG die Zyklisierungsreaktion wiederherstellt, so war unerwarteterweise eine noch stärkere Reduktion der Pigmente die Folge. Der geringste Chlorophyllgehalt wurde für die *ycf54*/FLAG-*ycf54* nach sieben tägiger Anzucht in BG11-Medium mit hohen Kupferkonzentrationen beobachtet (Tabelle 23, S. 89). Diese Ergebnisse eröffnen mögliche Hypothesen zur Rolle von Ycf54 über dessen Funktion in der Cyclase-Reaktion hinaus. Angenommen, dass die Überexpression von FLAG-*ycf54* zusätzliche temporäre Reduktionen der endogenen *ycf54*-Genkopien im *ycf54*-Mutantenhintergrund hervorruft, wäre es möglich, dass eine anschließende Repression der FLAG-*ycf54*-Expression infolge der Kupfersulfat-Zugabe zu einer gesamten Verringerung an *ycf54*-Genkopien führt und damit weitere Auswirkungen auf die Chlorophyllbiosynthese hat. Die Daten der Komplementationsversuche führen zu der Vermutung, dass neben der mutmaßlichen Funktion von Ycf54 in der Tetrapyrrolbiosynthese, ein Überangebot dieses Proteins die Stabilität von pigmentbindenden Proteinen in den photosynthetischen Reaktionszentren und Antennenkomplexen und/oder die Assemblierung von chlorophyll- und phycobilinbindenden Proteinen beeinträchtigt. Obwohl allgemein pleiotrope Effekte durch eine FLAG-Ycf54-Überexpression auf die Transkriptions- oder Translationskontrolle zu dem aktuellen Zeitpunkt der Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden können, kann ein regulatorischer Zusammenhang zwischen der Cyclase-Reaktion und der Assemblierung

pigmentbindender Proteine angenommen werden. Dadurch könnte eine Ausbalancierung beider zuletzt genannten Prozesse durch Ycf54 ermöglicht werden. Zukünftige Studien sollten durchgeführt werden, um mögliche Verbindungen der Chlorophyllbiosynthese und der Integration der Chlorophylle und Phycobiline in die Reaktionszentren sowie Antennenkomplexe cyanobakterieller Photosysteme aufzuzeigen.

Durch die parallele Untersuchung der stabilen LCAA-Überexpression in *Arabidopsis* und den unmittelbaren Vergleich mit den *Synechocystis*-Mutanten erschließen sich mögliche Erkenntnisse über konservierte und/oder neue Funktionen des homologen Proteins im Laufe der Evolution. In diesem Zusammenhang lieferten tatsächlich die physiologischen Analysen zur AtLCAA-Überexpression gegenüber den Beobachtungen einer induzierten FLAG-Ycf54-Expression unterschiedliche Effekte. Phänotypisch unterscheiden sich die AtLCAA-überexprimierenden Pflanzen nicht vom Wildtyp (Abbildung 38, S. 115). Korrelierend dazu zeigten sich auch in den Pigmentgehalten keine Auffälligkeiten (Abbildung 39, S. 116; Tabelle 27, S. 117). Allerdings deuten die Western-Blot-Daten, die in den Überexpressionslinien erhöhte Mengen an FLU, CHL27, POR, LHCA1 und PSBS belegen (Abbildung 40, S. 118), auf eine durch das LCAA-Überangebot speziell den Cyclase-Komplex und die LHCs verstärkt stabilisierende Rolle von LCAA. Zusammen mit der massenspektrometrischen Analyse der AtLCAA-Pulldown-Experimente wird in dieser Arbeit ein hypothetisches Modell zur Funktion von LCAA in höheren Pflanzen vorgeschlagen, das im Abschnitt 4.9 erläutert ist. Die Transformation von *Arabidopsis* mit dem *AtLCAA-sense*-Transgen führte darüber hinaus in einigen Nachkommen zu einem RNA-„Silencing“, sodass die Expression beider Gene, Transgen und endogenem *LCAA*-Gen, simultan supprimiert war und eine sogenannte Cosuppression auftrat (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Der chlorotische Phänotyp (Abbildung 38, S. 115), das erhöhte Chlorophyll *a/b*-Verhältnis (Abbildung 39, S. 116) und die eindrucksvollen MgProtoME-Akkumulationen (Tabelle 27, S. 117) korrelieren mit dem detektierten CHL27-Mangel (Abbildung 40A, S. 118) und entsprechen exakt den Ergebnissen von den *LCAA*-Antisense-Linien. Ebenfalls korrespondieren die erhöhten GluTR-Gehalte und die in der Tendenz gesteigerten ALA-Syntheseraten (Abbildung 40B, S. 118) mit den Beobachtungen des LCAA-Defizits in Tabak. Es wäre von besonderem Interesse, in Anlehnung an die Resultate von Bolívar *et al.* (2014), zu verifizieren, ob sich ein Überschuss an LCAA ggfs. negativ auf die Stimulation der Cyclase-Aktivität in *Arabidopsis* oder Tabak auswirkt. Bislang blieben die unternommenen Versuche zur Durchführung eines Cyclase-Assays noch ohne Erfolg. Die in dieser Arbeit

begonnene, heterologe Expression der putativen Cyclase-Untereinheiten CHL27/CycI und LCAA/Ycf54 bietet hierbei eine aussichtsreiche Grundlage für zukünftige Cyclase-Assays.

#### **4.8 Der LCAA-Mangel in höheren Pflanzen unterscheidet sich hinsichtlich der Feedback-Regulation auf die ALA-Synthese deutlich von der *ycf54*-Mutante und der *CHL27*-Antisense-Linie**

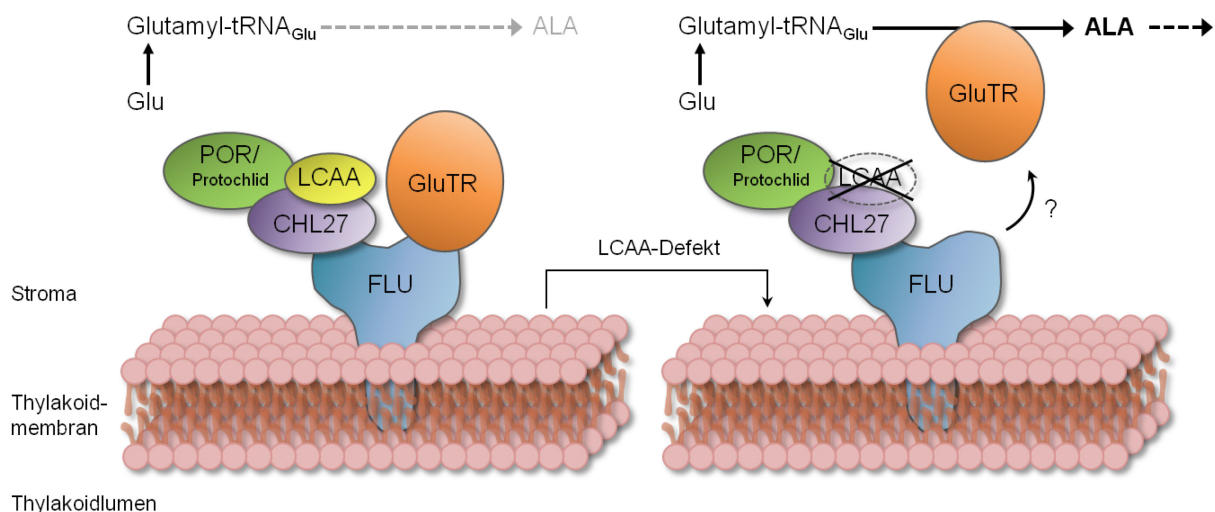
Der Vergleich von den dargestellten Ergebnissen der *ycf54*-Mutante und der *LCAA*-Antisense-Linien zeigt Unterschiede im Effekt des LCAA/Ycf54-Mangels, am auffälligsten ist die divergierende Regulation der ALA-Syntheserate. Obendrein zeigt sich, dass eine Deaktivierung von *LCAA* in Tabak eine andere Antwort der Tetrapyrrolbiosynthese-Enzyme hervorruft als ein CHL27-Mangel in transgenen Tabak-Linien, auch wenn beide Proteine putative Cyclase-Untereinheiten darstellen und ihr Phänotyp optisch sehr ähnlich ist. So weisen *CHL27*-Antisense-Pflanzen keine erhöhten ALA-Syntheseraten auf und akkumulieren auch nicht GluTR und CHLH (Peter *et al.*, 2010). Unter Berücksichtigung, dass beide Mutanten reduzierte CHL27-Proteingehalte aufweisen, müsste der auf die Tetrapyrrolbiosynthese abweichende Effekt in den *LCAA*-Antisense-Pflanzen auf die verminderte *LCAA*-Expression zurückzuführen sein, die entweder eine Feedback-kontrollierte Stimulation oder eine mangelnde Suppression der ALA-Synthese nach sich zieht. Wiederum kann dadurch noch nicht geklärt werden, warum die reprimierte Expression des homologen *ycf54*-Gens in *Synechocystis* eine gegensätzliche Auswirkung zeigt. Die Gegebenheit gestaltet sich als noch komplexer, wenn zudem der tageslängenabhängige Effekt auf die Physiologie der *LCAA*-Antisense-Pflanzen mit einbezogen wird. Infolge dieser Untersuchungen war in den Mutanten unter Kurztagbedingungen eine Abnahme der ALA-Syntheserate zu verzeichnen, während im Dauerlicht, korrelierend zu den Langtagbedingungen, eine gesteigerte Rate detektiert wurde (Abbildung 35A, S. 110). Auch wenn die metabolische Feedback-Kontrolle eine Schlüsselrolle innerhalb der Mechanismen zur Regulation des metabolischen Flusses der Tetrapyrrolbiosynthese einnimmt (Tanaka & Tanaka, 2007), so lassen sich hierin keine Ursachen für die unterschiedlichen Effekte finden. Schließlich wurden keine bedeutsamen Abweichungen in den Akkumulationen der Chlorophyllintermediate unter allen zu vergleichenden Gegebenheiten in den jeweiligen Mutanten ersichtlich. Auch Häm, das als Negativregulator durch die allosterische Hemmung der GluTR die ALA-Synthese inhibiert (Vothknecht *et al.*, 1998; Terry & Kendrick, 1999), kommt als mögliches Bindeglied

nicht in Frage, da die *LCAA*-Antisense-Linien sogar graduell verringerte Häm-Gehalte sowohl unter Kurztagbedingungen als auch im Dauerlicht aufweisen (Abbildung 35D, S. 110). Unter Zuhilfenahme der massenspektrometrischen Ergebnisse der AtLCAA-Pulldown-Experimente lassen sich aufschlussreiche Protein-Protein-Interaktionen von LCAA postulieren, die eine Erklärung für die verschiedenartige Regulation in *Synechocystis* und Tabak bzw. *Arabidopsis* bieten kann (s. Abschnitt 4.9). Zur Interpretation des tageslängenabhängigen Effektes auf die ALA-Synthese bei einem LCAA-Defizit bedarf es zum aktuellen Zeitpunkt zusätzlicher Untersuchungen. Die Analyse einer Doppelmutante, beispielsweise durch Kreuzung der *LCAA*- und *CHL27*-Antisense-Linien generiert, könnte weitere Hinweise geben, ob der zu beobachtende Effekt im Kurztag signifikant ist.

#### **4.9 Die potenzielle Funktion von LCAA - wegweisend für ein Modell zur Rolle von LCAA innerhalb der Tetrapyrrolbiosynthese höherer Pflanzen**

In früheren Arbeiten wurde der Cyclase-Untereinheit CHL27 eine Monooxygenase-ähnliche Proteinfunktion zugeschrieben (Berthold & Stenmark, 2003). Monooxygenase-verwandte Proteine setzen sich wiederum aus einer katalytischen, einer reduzierenden und einer strukturbildenden Untereinheit zusammen. Während CHL27 am wahrscheinlichsten die substratbindende Untereinheit mit der Eisenbindedomäne D/EX<sub>n</sub>EXXH darstellt, ist eine strukturelle Ähnlichkeit von LCAA mit einer Reduktase nicht gegeben. Demzufolge ist es denkbar, dass LCAA als Gerüstprotein fungiert, welches die Cyclase mit anderen Proteinen und/oder Regulatoren und/oder Metaboliten des Syntheseweges verbindet. Aufgrund dieser Vermutung und der Ergebnisse können drei mögliche Rollen vorgeschlagen werden: 1) LCAA ist eine essenzielle Komponente einer funktionellen Cyclase, die die Chlorophyllsynthese gewährleistet. 2) LCAA stellt zudem die Verknüpfung zwischen der Cyclase-Aktivität und der ALA-Synthese sicher, begründet in der metabolischen Feedback-Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese durch LCAA. 3) Ein LCAA-Mangel beeinträchtigt im Weiteren eine koordinierte Synthese von Chlorophyll *a* und *b* und/oder die Stabilität der LHC-Proteine. Die Vermutungen zur Funktion von Ycf54/LCAA im Metabolismus von Chlorophyllbindeproteinen wird zusätzlich dadurch untermauert, dass in sechs *Prochlorococcus*-Arten, die an limitierte Lichtbedingungen gewöhnt sind, keine LCAA-Homologe zu finden sind (Castruita *et al.*, 2011).

Maßgeblich trugen die in dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Analysen der 6xHis-AtLCAA-Pulldown-Experimente zur entscheidenden Identifikation putativer Interaktionspartner bei, auf Grundlage dieser ein Modell zur Rolle von LCAA innerhalb der Tetrapyrrolbiosynthese höherer Pflanzen vorgeschlagen werden kann. Der Nachweis der signifikanten Abundanz von CHL27, Geranylgeranyl-Reduktase, PORB und PORC in den 6xHis-AtLCAA-Pulldown-Eluaten (Tabelle 28, S. 122) bestätigt eine Beteiligung von LCAA in dem durch Kauss *et al.* (2012) beschriebenen FLU-kontrollierten Membrankomplex. Hierzu korrespondieren sehr gut die in den AtLCAA-Überexpressor-Pflanzen detektierten Proteinakkumulationen von FLU, CHL27 und POR (Abbildung 40, S. 118). Der Negativregulator FLU supprimiert im Dunkeln die ALA-Synthese, indem FLU Protochlid-vermittelt direkt mit GluTR interagiert und dessen Aktivität hemmt (Meskauskiene *et al.*, 2001). Die Inhibition der GluTR durch Häm und FLU erfolgt unabhängig voneinander (Goslings *et al.*, 2004), sodass übereinstimmend mit den physiologischen Daten (Abbildung 35D, S. 110) Häm als Feedback-Regulator ausgeschlossen werden kann. Auf diesen Daten basierend soll hier ein Modell präsentiert werden, in dem LCAA als essenzielle Cyclase-Komponente für eine FLU-abhängige Feedback-Kontrolle zwischen der Chlorophyllbiosynthese und der ALA-Synthese als unentbehrlich gedeutet wird (Abbildung 43).



**Abbildung 43:** Ein hypothetisches Modell zur Rolle von LCAA bei der Feedback-Regulation der ALA-Synthese innerhalb der Tetrapyrrolbiosynthese in Chloroplasten. Es wird vorgeschlagen, dass LCAA mit dem FLU-kontrollierten Cyclase-POR-Membrankomplex interagiert. Nachgewiesenermaßen bindet FLU im Dunkeln Protochlid-vermittelt GluTR (Meskauskiene *et al.*, 2001), sodass die ALA-Synthese reprimiert wird. Führt ein Defekt zu einem LCAA-Mangel, wird direkt oder indirekt die Interaktion zwischen FLU und GluTR gestört, infolgedessen die aus dem Komplex frei gewordene GluTR in aktiver Form ALA synthetisieren kann.



Hiernach würde ein Mangel von LCAA die Bindung der GluTR an FLU direkt oder indirekt stören, sodass GluTR aus dem Membrankomplex frei wird und in aktiver Form fortwährend ALA synthetisieren kann. Dieser vorgeschlagene Prozess müsste vor allem tagsüber geschehen und nachweisbar sein. In diesem Zusammenhang untermauern die Arbeiten von Goslings *et al.* (2004) eine in lichtadaptierten Pflanzen fortbestehende FLU-abhängige Kontrolle der Tetrapyrrolbiosynthese. Belege lieferten die in *Arabidopsis*-Wildtyp-Keimlingen detektierten, konstanten FLU-Proteinlevel und lichtinduzierten *FLU*-mRNA-Akkumulationen sowie die im Dauerlicht gesteigerten ALA-Syntheseraten in den *flu*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Da in grünen Pflanzen die Protochlid-Konzentration im Dauerlicht unter die Detektionsgrenze sinkt und folglich kein Risiko für photooxidative Schädigungen darstellt, wird ein vom Protochlid verschiedenes Effektormolekül vermutet.

In welcher Weise ein LCAA-Defekt die FLU-kontrollierte Feedback-Regulation unterbinden kann ist noch ungeklärt. Bislang konnten keine physikalischen Interaktionen zwischen LCAA und FLU und/oder GluTR nachgewiesen werden. Die Methode der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese könnte Antworten auf diese Fragestellung liefern und den Nachweis des putativen LCAA/FLU-Komplexes erbringen. Ebenfalls vermögen Pulldown-Versuche, die analog zu den hier beschriebenen Experimenten, jedoch im Dunkeln, durchgeführt werden, weiteren Aufschluss geben. Es ist durchaus denkbar, dass auch redoxabhängige Modifikationen eine Rolle spielen könnten, für die eine Beteiligung in Protein-Interaktionen mit Enzymen der Tetrapyrrolbiosynthese angedeutet sind (Richter *et al.*, 2013). Demnach ist anzunehmen, dass ein Mangel an NTRC zu einem größeren Anteil nichtreduzierter, konservierter Cysteinreste von GluTR, und auch von CHLM, führt. Als Konsequenz der Instabilität dieser Proteine und der folglich beeinträchtigten Aktivität wird der metabolische Fluss des gesamten Tetrapyrrolbiosyntheseweges abgeschwächt.

Ungeachtet möglicher regulatorischer Einflüsse bleibt festzuhalten, dass anhand des vorgeschlagenen Modells eine Erklärung für die Diskrepanz hinsichtlich des LCAA-Mangel-Effektes auf die ALA-Synthese in *Synechocystis* und höheren Pflanzen gegeben werden kann. Da Cyanobakterien kein FLU-homologes Protein und damit einhergehend keine FLU-kontrollierte Feedback-Regulation auf die ALA-Synthese aufweisen, ist auch keine LCAA-Defizienz-bedingte Entkopplung dieser Regulation möglich. Das wiederum konträr den Modellvorstellungen verstärkte FLU-Protein in den Cosuppressions-Linien von *Arabidopsis* (Abbildung 40, S. 118) ist womöglich das Resultat einer Gegenregulation, de

facto jedoch noch nicht verstanden. Ohne das erforderliche LCAA scheint auch eine FLU-Überexpression nicht die Hemmung der Interaktion mit GluTR abwehren zu können. Wiederum wenn erhöhte FLU-Proteingehalte vorliegen, wäre anzunehmen, dass sich die GluTR-Inaktivierung auch ohne Anwesenheit von LCAA auswirkt.

Zukünftige Arbeiten werden potenzielle Interaktionen von LCAA mit anderen Proteinen der Chlorophyllbiosynthese und/oder plastidären Proteinen aufdecken und darüber aufklären können, wie die Assemblierung von Chlorophyll in die chlorophyllbindenden, photosynthetischen Proteine exakt erfolgt. Ein funktionelles Zusammenspiel der Cyclase mit weiteren Komponenten der Chlorophyllsynthese könnte die Integrität des Chlorophyllstoffwechsels sicherstellen und eine effiziente Assemblierung von Chlorophyll in die chlorophyllbindenden Proteine erleichtern.

## Literaturverzeichnis

- Al-Thabet, S. S.** (2006). Promotive effect of 5-amino levulinic acid on growth and yield of wheat grown under dry conditions. *J Agron* 5: 45-49.
- Alawady, A. E. und Grimm, B.** (2005). Tobacco Mg protoporphyrin IX methyltransferase is involved in inverse activation of Mg porphyrin and protoheme synthesis. *Plant J* 41(2): 282-290.
- Albus, C. A., Ruf, S., Schöttler, M. A., Lein, W., Kehr, J. und Bock, R.** (2010). Y3IP1, a nucleus-encoded thylakoid protein, cooperates with the plastid-encoded Ycf3 protein in photosystem I assembly of tobacco and Arabidopsis. *Plant Cell* 22(8): 2838-2855.
- Albus, C. A., Salinas, A., Czarnecki, O., Kahlau, S., Rothbart, M., Thiele, W., Lein, W., Bock, R., Grimm, B. und Schöttler, M. A.** (2012). LCAA, a novel factor required for magnesium protoporphyrin monomethylester cyclase accumulation and feedback control of aminolevulinic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 160(4): 1923-1939.
- Allen, J. F.** (1993). Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* 165(4): 609-631.
- Allen, J. F. und Raven, J. A.** (1996). Free-radical-induced mutation vs redox regulation: costs and benefits of genes in organelles. *J Mol Evol* 42(5): 482-492.
- Allen, M. M. und Smith, A. J.** (1969). Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch Mikrobiol* 69(2): 114-120.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-410.
- Apel, K., Santel, H. J., Redlinger, T. E. und Falk, H.** (1980). The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Isolation and characterization of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur J Biochem* 111(1): 251-258.
- Arabidopsis Genome, I.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): 796-815.
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustun, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W. und Bornke, F.** (2010). Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 22(5): 1498-1515.
- Avesani, L., Marconi, G., Morandini, F., Albertini, E., Bruschetta, M., Bortesi, L., Pezzotti, M. und Porceddu, A.** (2007). Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res* 16(5): 587-597.

- Awad, M. A.** (2008). Promotive effect of a 5-aminolevulinic acid-based fertilizer on growth of tissue culture-derived date palm plants (*Phoenix dactylifera* L.) during acclimation. *Sci Hort* 118: 48-52.
- Bancroft, I., Wolk, C. P. und Oren, E. V.** (1989). Physical and genetic maps of the genome of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 171(11): 5940-5948.
- Bang, W. Y., Jeong, I. S., Kim, D. W., Im, C. H., Ji, C., Hwang, S. M., Kim, S. W., Son, Y. S., Jeong, J., Shiina, T. und Bahk, J. D.** (2008). Role of Arabidopsis CHL27 protein for photosynthesis, chloroplast development and gene expression profiling. *Plant Cell Physiol* 49(9): 1350-1363.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K. und Miyano, S.** (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18(2): 298-305.
- Barber, J.** (2009). Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. *Chem Soc Rev* 38(1): 185-196.
- Battersby, A. R.** (2000). Tetrapyrroles: the pigments of life. *Nat Prod Rep* 17(6): 507-526.
- Battersby, A. R., Fookes, C. J., Matcham, G. W. und McDonald, E.** (1980). Biosynthesis of the pigments of life: formation of the macrocycle. *Nature* 285(5759): 17-21.
- Baulcombe, D. C.** (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* 2(2): 109-113.
- Beale, S. I.** (1999). Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth Res* 60(1): 43-73.
- Beale, S. I.** (2011). Chloroplast signaling: retrograde regulation revelations. *Curr Biol* 21(10): R391-393.
- Beale, S. I., Gough, S. P. und Granick, S.** (1975). Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(7): 2719-2723.
- Beck, C. F.** (2001). Signaling pathways in chloroplast-to-nucleus communication. *Protist* 152(3): 175-182.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R.** (1992). New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* 20(6): 1195-1197.
- Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P. L., Rumble, D., 3rd, Stein, H. J., Hannah, J. L., Coetzee, L. L. und Beukes, N. J.** (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* 427(6970): 117-120.
- Bensadoun, A. und Weinstein, D.** (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* 70(1): 241-250.

- Berthold, D. A. und Stenmark, P.** (2003). Membrane-bound diiron carboxylate proteins. *Annu Rev Plant Biol* 54: 497-517.
- Blankenship, R. E. und Hartman, H.** (1998). The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem Sci* 23(3): 94-97.
- Bogorad, L.** (1958a). The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. I. Uroporphyrinogen I. *J Biol Chem* 233: 501-509.
- Bogorad, L.** (1958b). The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. II. Uroporphyrin III. *J Biol Chem* 233: 510-515.
- Bollivar, D., Braumann, I., Berendt, K., Gough, S. P. und Hansson, M.** (2014). The Ycf54 protein is part of the membrane component of Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase from barley (*Hordeum vulgare* L.). *FEBS J* 281(10): 2377-2386.
- Bollivar, D. W.** (2006). Recent advances in chlorophyll biosynthesis. *Photosynth Res* 90(2): 173-194.
- Bollivar, D. W. und Beale, S. I.** (1996). The Chlorophyll Biosynthetic Enzyme Mg-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester (Oxidative) Cyclase (Characterization and Partial Purification from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* sp. PCC 6803). *Plant Physiol* 112(1): 105-114.
- Bollivar, D. W., Elliott, T. und Beale, S. I.** (1995). Anaerobic protoporphyrin biosynthesis does not require incorporation of methyl groups from methionine. *J Bacteriol* 177(20): 5778-5783.
- Bollivar, D. W., Suzuki, J. Y., Beatty, J. T., Dobrowolski, J. M. und Bauer, C. E.** (1994). Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Biol* 237(5): 622-640.
- Boudreau, E., Takahashi, Y., Lemieux, C., Turmel, M. und Rochaix, J. D.** (1997). The chloroplast ycf3 and ycf4 open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex. *EMBO J* 16(20): 6095-6104.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Burke, D. H., Alberti, M. und Hearst, J. E.** (1993). bchFNBH bacteriochlorophyll synthesis genes of *Rhodobacter capsulatus* and identification of the third subunit of light-independent protochlorophyllide reductase in bacteria and plants. *J Bacteriol* 175(8): 2414-2422.
- Castruita, M., Casero, D., Karpowicz, S. J., Kropat, J., Vieler, A., Hsieh, S. I., Yan, W., Cokus, S., Loo, J. A., Benning, C., Pellegrini, M. und Merchant, S. S.** (2011). Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. *Plant Cell* 23(4): 1273-1292.

- Cavalier-Smith, T.** (1982). The Origins of Plastids. *Biol J Linn Soc* 17(3): 289-306.
- Chan, C. X. und Bhattacharya, D.** (2010). The origin of plastids. *Nature Edu* 3(9): 84.
- Chan, C. X., Gross, J., Yoon, H. S. und Bhattacharya, D.** (2011). Plastid Origin and Evolution: New Models Provide Insights into Old Problems. *Plant Physiol* 155(4): 1552-1560.
- Che, F. S., Watanabe, N., Iwano, M., Inokuchi, H., Takayama, S., Yoshida, S. und Isogai, A.** (2000). Molecular characterization and subcellular localization of protoporphyrinogen oxidase in spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 124(1): 59-70.
- Chereskin, B. M., Wong, Y. S. und Castelfranco, P. A.** (1982). In Vitro Synthesis of the Chlorophyll Isocyclic Ring : Transformation of Magnesium-Protoporphyrin IX and Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester into Magnesium-2,4-Divinyl Pheoporphyrin A(5). *Plant Physiol* 70(4): 987-993.
- Chew, A. G. und Bryant, D. A.** (2007). Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity. *Annu Rev Microbiol* 61: 113-129.
- Christie, J. M. und Jenkins, G. I.** (1996). Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in Arabidopsis cells. *Plant Cell* 8(9): 1555-1567.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16(6): 735-743.
- Collier, J. L. und Grossman, A. R.** (1992). Chlorosis Induced by Nutrient Deprivation in Synechococcus Sp Strain Pcc-7942 - Not All Bleaching Is the Same. *J Bacteriol* 174(14): 4718-4726.
- Cornah, J. E., Terry, M. J. und Smith, A. G.** (2003). Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway? *Trends Plant Sci* 8(5): 224-230.
- Czarnecki, O., Gläßer, C., Chen, J. G., Mayer, K. F. und Grimm, B.** (2012). Evidence for a Contribution of ALA Synthesis to Plastid-To-Nucleus Signaling. *Front Plant Sci* 3: 236.
- Czarnecki, O. und Grimm, B.** (2012). Post-translational control of tetrapyrrole biosynthesis in plants, algae, and cyanobacteria. *J Exp Bot* 63(4): 1675-1687.
- Czarnecki, O., Hedtke, B., Melzer, M., Rothbart, M., Richter, A., Schröter, Y., Pfannschmidt, T. und Grimm, B.** (2011). An Arabidopsis GluTR binding protein mediates spatial separation of 5-aminolevulinic acid synthesis in chloroplasts. *Plant Cell* 23(12): 4476-4491.
- Davies, R. C. und Neuberger, A.** (1979a). Control of 5-aminolaevulinate synthetase activity in Rhodospseudomonas spheroides. Binding of pyridoxal phosphate to 5-aminolaevulinate synthetase. *Biochem J* 177(2): 661-671.

- Davies, R. C. und Neuberger, A.** (1979b). Control of 5-aminolaevulinate synthetase activity in *Rhodospseudomonas spheroides*. Purification and properties of the high-activity form of the enzyme. *Biochem J* 177(2): 649-659.
- Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D. J., Coutu, J., Shulaev, V., Schlauch, K. und Mittler, R.** (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17(1): 268-281.
- De Las Rivas, J., Lozano, J. J. und Ortiz, A. R.** (2002). Comparative analysis of chloroplast genomes: functional annotation, genome-based phylogeny, and deduced evolutionary patterns. *Genome Res* 12(4): 567-583.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. und Michel, H.** (1984). X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol* 180(2): 385-398.
- Dinesh-Kumar, S. P., Anandalakshmi, R., Marathe, R., Schiff, M. und Liu, Y.** (2003). Virus-induced gene silencing. *Methods Mol Biol* 236: 287-294.
- Drummond, A. J. und Rambaut, A.** (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214.
- Dühring, U., Irrgang, K. D., Lunser, K., Kehr, J. und Wilde, A.** (2006). Analysis of photosynthetic complexes from a cyanobacterial *ycf37* mutant. *Biochim Biophys Acta* 1757(1): 3-11.
- Eichacker, L. A., Helfrich, M., Rüdiger, W. und Müller, B.** (1996). Stabilization of chlorophyll a-binding apoproteins P700, CP47, CP43, D2, and D1 by chlorophyll a or Zn-pheophytin a. *J Biol Chem* 271(50): 32174-32179.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H.** (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2(4): 953-971.
- Emerson, R. und Lewis, C. M.** (1943). The dependence of the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis on wave length of light. *Am J Bot* 30(3): 165-178.
- Eng, J. K., McCormack, A. L. und Yates, J. R.** (1994). An Approach to Correlate Tandem Mass-Spectral Data of Peptides with Amino-Acid-Sequences in a Protein Database. *J Am Soc Mass Spectrom* 5(11): 976-989.
- Falkowski, P. G.** (2006). Evolution. Tracing oxygen's imprint on earth's metabolic evolution. *Science* 311(5768): 1724-1725.
- Ferro, M., Brugiere, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellal, M., Le Gall, S., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., Garin, J., Joyard, J., Masselon, C. und Rolland, N.** (2010). AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics* 9(6): 1063-1084.

- Franche, C. und Damerval, T.** (1988). Tests on Nif Probes and DNA Hybridizations. *Meth Enzymol* 167: 803-808.
- Fuchs, G. H.** (Hrsg.) (2006). Allgemeine Mikrobiologie (begründet von H.-G. Schlegel). Stuttgart, *Georg Thieme Verlag*.
- Fuesler, T. P., Wong, Y. S. und Castelfranco, P. A.** (1984). Localization of Mg-Chelatase and Mg-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester (Oxidative) Cyclase Activities within Isolated, Developing Cucumber Chloroplasts. *Plant Physiol* 75(3): 662-664.
- Garrido-Franco, M.** (2003). Pyridoxine 5'-phosphate synthase: de novo synthesis of vitamin B6 and beyond. *Biochim Biophys Acta* 1647(1-2): 92-97.
- Goslings, D., Meskauskiene, R., Kim, C., Lee, K. P., Nater, M. und Apel, K.** (2004). Concurrent interactions of heme and FLU with Glu tRNA reductase (HEMA1), the target of metabolic feedback inhibition of tetrapyrrole biosynthesis, in dark- and light-grown Arabidopsis plants. *Plant J* 40(6): 957-967.
- Gough, S. P., Petersen, B. O. und Duus, J. O.** (2000). Anaerobic chlorophyll isocyclic ring formation in *Rhodobacter capsulatus* requires a cobalamin cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6908-6913.
- Granick, S.** (1959). Magnesium porphyrins formed by barley seedlings treated with  $\delta$ -aminolevulinic acid. *Plant Physiol* 34 (Suppl.): XVIII.
- Granick, S. und Jaffe, H.** (1961). Magnesium Protoporphyrin Monoester and Protoporphyrin Monomethyl Ester in Chlorophyll Biosynthesis. *J Biol Chem* 236(4): 1168-1172.
- Granick, S. und Mauzerall, D.** (1958). Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting delta-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. *J Biol Chem* 232: 1119-1140.
- Grimm, B.** (2010). Control of the Metabolic Flow in Tetrapyrrole Biosynthesis: Regulation of Expression and Activity of Enzymes in the Mg Branch of Tetrapyrrole Biosynthesis. The Chloroplast. C. A. Rebeiz, Benning, C., Bohnert, H. J., Daniel, H., Hooper, K., Lichtenthaler, H. K., Portis, A. R., Tripathy, B. C. (Hrsg.). Springer, Dordrecht. The Netherlands: 39-53.
- Grimm, B., Bull, A., Welinder, K. G., Gough, S. P. und Kannangara, C. G.** (1989). Purification and partial amino acid sequence of the glutamate 1-semialdehyde aminotransferase of barley and *synechococcus*. *Carlsberg Res Commun* 54(2): 67-79.
- Hallick, R. B. und Bairoch, A.** (1994). Proposals for the naming of chloroplast genes. III. Nomenclature for open reading frames encoded in chloroplast genomes. *Plant Mol Biol Rep* 12: 29-30.
- Hampp, C., Richter, A., Osorio, S., Zellnig, G., Sinha, A. K., Jammer, A., Fernie, A. R., Grimm, B. und Roitsch, T.** (2012). Establishment of a photoautotrophic cell suspension culture of *Arabidopsis thaliana* for photosynthetic, metabolic, and signaling studies. *Mol Plant* 5(2): 524-527.



- Hedtke, B., Alawady, A., Chen, S., Bornke, F. und Grimm, B.** (2007). HEMA RNAi silencing reveals a control mechanism of ALA biosynthesis on Mg chelatase and Fe chelatase. *Plant Mol Biol* 64(6): 733-742.
- Herbst, J.** (2014). Functional analysis of the LCAA/YCF54 protein, a subunit of the magnesium protoporphyrin IX monomethylester cyclase. Masterarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Hill, R. und Bendall, F.** (1960). Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis. *Nature* 186: 136-137.
- Hohmann-Marriott, M. F. und Blankenship, R. E.** (2011). Evolution of Photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 62: 515-548.
- Hollingshead, S., Kopečna, J., Jackson, P. J., Canniffe, D. P., Davison, P. A., Dickman, M. J., Sobotka, R. und Hunter, C. N.** (2012). Conserved chloroplast open-reading frame ycf54 is required for activity of the magnesium protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* 287(33): 27823-27833.
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, L. S. und Hoekema, A.** (1993). New *Agrobacterium* Helper Plasmids for Gene-Transfer to Plants. *Transgenic Res* 2(4): 208-218.
- Howe, C. J., Barbrook, A. C., Koumandou, V. L., Nisbet, R. E. R., Symington, H. A. und Wightman, T. F.** (2003). Evolution of the chloroplast genome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358(1429): 99-106.
- Huang, D. D. und Wang, W. Y.** (1986). Chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas* starts with the formation of glutamyl-tRNA. *J Biol Chem* 261(29): 13451-13455.
- Huang, W., Ling, Q., Bedard, J., Lilley, K. und Jarvis, P.** (2011). In vivo analyses of the roles of essential Omp85-related proteins in the chloroplast outer envelope membrane. *Plant Physiol* 157(1): 147-159.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R. D., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Laugraud, A., Letunic, I., Lonsdale, D., Lopez, R., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., Mistry, J., Mitchell, A., Mulder, N., Natale, D., Orengo, C., Quinn, A. F., Selengut, J. D., Sigrist, C. J., Thimma, M., Thomas, P. D., Valentin, F., Wilson, D., Wu, C. H. und Yeats, C.** (2009). InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D211-215.
- Hutin, C., Havaux, M., Carde, J. P., Kloppstech, K., Meierhoff, K., Hoffman, N. und Nussaume, L.** (2002). Double mutation cpSRP43--/cpSRP54-- is necessary to abolish the cpSRP pathway required for thylakoid targeting of the light-harvesting chlorophyll proteins. *Plant J* 29(5): 531-543.
- Jacobs, J. M. und Jacobs, N. J.** (1984). Protoporphyrinogen oxidation, an enzymatic step in heme and chlorophyll synthesis: partial characterization of the reaction in plant

- organelles and comparison with mammalian and bacterial systems. *Arch Biochem Biophys* 229(1): 312-319.
- Johanningmeier, U. und Howell, S. H.** (1984). Regulation of light-harvesting chlorophyll-binding protein mRNA accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Possible involvement of chlorophyll synthesis precursors. *J Biol Chem* 259(21): 13541-13549.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J. und Rolland, N.** (2009). Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant* 2(6): 1154-1180.
- Juric, S., Hazler-Pilepic, K., Tomasic, A., Lepedus, H., Jelacic, B., Puthiyaveetil, S., Bionda, T., Vojta, L., Allen, J. F., Schleiff, E. und Fulgosi, H.** (2009). Tethering of ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase to thylakoid membranes is mediated by novel chloroplast protein TROL. *Plant J* 60(5): 783-794.
- Kada, S., Koike, H., Satoh, K., Hase, T. und Fujita, Y.** (2003). Arrest of chlorophyll synthesis and differential decrease of Photosystems I and II in a cyanobacterial mutant lacking light-independent protochlorophyllide reductase. *Plant Mol Biol* 51(2): 225-235.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S.** (1996a). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* 3(3): 109-136.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S.** (1996b). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res* 3(3): 185-209.
- Kashino, Y., Takahashi, T., Inoue-Kashino, N., Ban, A., Ikeda, Y., Satoh, K. und Sugiura, M.** (2007). Ycf12 is a core subunit in the photosystem II complex. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1767(11): 1269-1275.
- Kauss, D., Bischof, S., Steiner, S., Apel, K. und Meskauskiene, R.** (2012). FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the Mg(++)-branch of this pathway. *FEBS Lett* 586(3): 211-216.
- Keegstra, K. und Cline, K.** (1999). Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* 11(4): 557-570.

- Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E. und Aebersold, R.** (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74(20): 5383-5392.
- Kelley, L. A. und Sternberg, M. J.** (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4(3): 363-371.
- Kindgren, P., Eriksson, M. J., Benedict, C., Mohapatra, A., Gough, S. P., Hansson, M., Kieselbach, T. und Strand, A.** (2011). A novel proteomic approach reveals a role for Mg-protoporphyrin IX in response to oxidative stress. *Physiol Plant* 141(4): 310-320.
- Kindgren, P., Noren, L., Lopez Jde, D., Shaikhali, J. und Strand, A.** (2012). Interplay between Heat Shock Protein 90 and HY5 controls PhANG expression in response to the GUN5 plastid signal. *Mol Plant* 5(4): 901-913.
- Kittsteiner, U., Brunner, H. und Rüdiger, W.** (1991). The greening process in cress seedlings. II. Complexing agents and 5-aminolevulinate inhibit accumulation of cab-mRNA coding for the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Physiol Plant* 81(2): 190-196.
- Klimyuk, V. I., Persello-Cartieaux, F., Havaux, M., Contard-David, P., Schuenemann, D., Meierhoff, K., Gouet, P., Jones, J. D., Hoffman, N. E. und Nussaume, L.** (1999). A chromodomain protein encoded by the arabidopsis CAO gene is a plant-specific component of the chloroplast signal recognition particle pathway that is involved in LHCP targeting. *Plant Cell* 11(1): 87-99.
- Koch, K. E., Wu, Y. und Xu, J.** (1996). Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. *J Exp Bot* 47 Spec No: 1179-1185.
- Kolossov, V. L. und Rebeiz, C. A.** (2010). Evidence for various 4-vinyl reductase activities in higher plants. The Chloroplast: Basics and Applications. C. A. Rebeiz, C. Benning, H. Bohnert et al (Hrsg.). Springer. Dordrecht (The Netherlands): 25-38.
- Komenda, J., Sobotka, R. und Nixon, P. J.** (2012). Assembling and maintaining the Photosystem II complex in chloroplasts and cyanobacteria. *Curr Opin Plant Biol* 15(3): 245-251.
- Koncz, C. und Schell, J.** (1986). The Promoter of T1-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector. *Mol Gen Genet* 204(3): 383-396.
- Koski, V. M. und Smith, J. H. C.** (1948). The Isolation and Spectral Absorption Properties of Protochlorophyll from Etiolated Barley Seedlings. *J Am Chem Soc* 70(11): 3558-3562.
- Kruse, E., Mock, H. P. und Grimm, B.** (1995). Reduction of coproporphyrinogen oxidase level by antisense RNA synthesis leads to deregulated gene expression of plastid proteins and affects the oxidative defense system. *EMBO J* 14(15): 3712-3720.

- Kunst, L.** (1998). Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* 82: 43-48.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lane, N. und Martin, W.** (2010). The energetics of genome complexity. *Nature* 467(7318): 929-934.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. und Higgins, D. G.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Larkin, R. M., Alonso, J. M., Ecker, J. R. und Chory, J.** (2003). GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science* 299(5608): 902-906.
- Lein, W., Usadel, B., Stitt, M., Reindl, A., Ehrhardt, T., Sonnewald, U. und Bornke, F.** (2008). Large-scale phenotyping of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) to identify essential leaf functions. *Plant Biotechnol J* 6(3): 246-263.
- Leister, D.** (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* 19(1): 47-56.
- Lermontova, I., Kruse, E., Mock, H. P. und Grimm, B.** (1997). Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16): 8895-8900.
- Lichtenthaler, H. K.** (1987). Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148: 350-382.
- Lidholm, J. und Gustafsson, P.** (1991). The chloroplast genome of the gymnosperm *Pinus contorta*: a physical map and a complete collection of overlapping clones. *Curr Genet* 20(1-2): 161-166.
- Link, S., Engelmann, K., Meierhoff, K. und Westhoff, P.** (2012). The atypical short-chain dehydrogenases HCF173 and HCF244 are jointly involved in translational initiation of the *psbA* mRNA of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 160(4): 2202-2218.
- Liu, Z. F., Yan, H. C., Wang, K. B., Kuang, T. Y., Zhang, J. P., Gui, L. L., An, X. M. und Chang, W. R.** (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 angstrom resolution. *Nature* 428(6980): 287-292.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265-275.

- Lu, Y., Savage, L. J., Larson, M. D., Wilkerson, C. G. und Last, R. L.** (2011). Chloroplast 2010: a database for large-scale phenotypic screening of Arabidopsis mutants. *Plant Physiol* 155(4): 1589-1600.
- Lunn, J. E.** (2007). Compartmentation in plant metabolism. *J Exp Bot* 58(1): 35-47.
- Lutz, C., Roper, U., Beer, N. S. und Griffiths, T.** (1981). Sub-etioplast localization of the enzyme NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur J Biochem* 118(2): 347-353.
- Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M. und Kowallik, K. V.** (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393(6681): 162-165.
- Masuda, T. und Takamiya, K.** (2004). Novel Insights into the Enzymology, Regulation and Physiological Functions of Light-dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase in Angiosperms. *Photosynth Res* 81(1): 1-29.
- Mauzerall, D. und Granick, S.** (1956). The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem* 219(1): 435-446.
- McBride, K. E. und Summerfelt, K. R.** (1990). Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 14(2): 269-276.
- Memon, S. A., Hou, X., Wang, L. J. und Li, Y.** (2009). Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on chlorophyll, antioxidative enzymes and photosynthesis of Pakchoi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *communis* Tsen et Lee). *Acta Physiol Plant* 31: 51-57.
- Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F., op den Camp, R. und Apel, K.** (2001). FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12826-12831.
- Meyer, W. und Spiteller, G.** (1997). Oxidized phytosterols increase by ageing in photoautotrophic cell cultures of Chenopodium rubrum. *Phytochemistry* 45(2): 297-302.
- Minamizaki, K., Mizoguchi, T., Goto, T., Tamiaki, H. und Fujita, Y.** (2008). Identification of two homologous genes, chlAI and chlAII, that are differentially involved in isocyclic ring formation of chlorophyll a in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 283(5): 2684-2692.
- Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C. M., Dienst, D., Bantscheff, J., Voss, B., Steglich, C., Wilde, A., Vogel, J. und Hess, W. R.** (2011). An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(5): 2124-2129.
- Mochizuki, N., Brusslan, J. A., Larkin, R., Nagatani, A. und Chory, J.** (2001). Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 2053-2058.

- Mochizuki, N., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, A. G., Tanaka, A. und Terry, M. J.** (2010). The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends Plant Sci* 15(9): 488-498.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T. und Nagatani, A.** (2008). The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 15184-15189.
- Mock, H. P. und Grimm, B.** (1997). Reduction of Uroporphyrinogen Decarboxylase by Antisense RNA Expression Affects Activities of Other Enzymes Involved in Tetrapyrrole Biosynthesis and Leads to Light-Dependent Necrosis. *Plant Physiol* 113(4): 1101-1112.
- Moore, I., Samalova, M. und Kurup, S.** (2006). Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J* 45(4): 651-683.
- Moseley, J., Quinn, J., Eriksson, M. und Merchant, S.** (2000). The Crd1 gene encodes a putative di-iron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 19(10): 2139-2151.
- Moseley, J. L., Page, M. D., Alder, N. P., Eriksson, M., Quinn, J., Soto, F., Theg, S. M., Hippler, M. und Merchant, S.** (2002). Reciprocal expression of two candidate di-iron enzymes affecting photosystem I and light-harvesting complex accumulation. *Plant Cell* 14(3): 673-688.
- Moulin, M., McCormac, A. C., Terry, M. J. und Smith, A. G.** (2008). Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39): 15178-15183.
- Moulin, M. und Smith, A. G.** (2005). Regulation of tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 4): 737-742.
- Mulder, N. J. und Apweiler, R.** (2008). The InterPro database and tools for protein domain analysis. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 2: Unit 2 7.
- Muller, H. J.** (1964). The Relation of Recombination to Mutational Advance. *Mutation Research* 1(1): 2-9.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- Nagai, S., Koide, M., Takahashi, S., Kikuta, A., Aono, M., Sasaki-Sekimoto, Y., Ohta, H., Takamiya, K. und Masuda, T.** (2007). Induction of isoforms of tetrapyrrole biosynthetic enzymes, AtHEMA2 and AtFC1, under stress conditions and their physiological functions in Arabidopsis. *Plant Physiol* 144(2): 1039-1051.

- Nagata, N., Tanaka, R. und Tanaka, A.** (2007). The major route for chlorophyll synthesis includes [3,8-divinyl]-chlorophyllide a reduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 48(12): 1803-1808.
- Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., Tabata, R., Kawai, T., Tanaka, K., Niwa, Y., Watanabe, Y., Nakamura, K., Kimura, T. und Ishiguro, S.** (2007). Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(8): 2095-2100.
- Nakao, M., Okamoto, S., Kohara, M., Fujishiro, T., Fujisawa, T., Sato, S., Tabata, S., Kaneko, T. und Nakamura, Y.** (2010). CyanoBase: the cyanobacteria genome database update 2010. *Nucleic Acids Res* 38(Database issue): D379-381.
- Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2(4): 279-289.
- Nasrulhaq-Boyce, A., Griffiths, W. T. und Jones, O. T.** (1987). The use of continuous assays to characterize the oxidative cyclase that synthesizes the chlorophyll isocyclic ring. *Biochem J* 243(1): 23-29.
- Oelmüller, R. und Mohr, H.** (1986). Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta* 167(1): 106-113.
- op den Camp, R. G., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Gobel, C., Feussner, I., Nater, M. und Apel, K.** (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(10): 2320-2332.
- Oster, U., Brunner, H. und Rüdiger, W.** (1996). The greening process in cress seedlings. V. Possible interference of chlorophyll precursors, accumulated after thujaplicin treatment, with light-regulated expression of *Lhc* genes. *J Photochem Photobiol B* 36(3): 255-261.
- Oster, U., Tanaka, R., Tanaka, A. und Rüdiger, W.** (2000). Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 21(3): 305-310.
- Ouchane, S., Steunou, A. S., Picaud, M. und Astier, C.** (2004). Aerobic and anaerobic Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclases in purple bacteria: a strategy adopted to bypass the repressive oxygen control system. *J Biol Chem* 279(8): 6385-6394.
- Palmer, J. D.** (2000). Molecular evolution - A single birth of all plastids? *Nature* 405(6782): 32-33.
- Papenbrock, J. und Grimm, B.** (2001). Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis--studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta* 213(5): 667-681.

- Papenbrock, J., Mock, H. P., Tanaka, R., Kruse, E. und Grimm, B. (2000a).** Role of magnesium chelatase activity in the early steps of the tetrapyrrole biosynthetic pathway. *Plant Physiol* 122(4): 1161-1169.
- Papenbrock, J., Pfundel, E., Mock, H. P. und Grimm, B. (2000b).** Decreased and increased expression of the subunit CHL I diminishes Mg chelatase activity and reduces chlorophyll synthesis in transgenic tobacco plants. *Plant J* 22(2): 155-164.
- Pego, J. V., Kortstee, A. J., Huijser, C. und Smeekens, S. C. (2000).** Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* 51 Spec No: 407-416.
- Peter, E. und Grimm, B. (2009).** GUN4 is required for posttranslational control of plant tetrapyrrole biosynthesis. *Mol Plant* 2(6): 1198-1210.
- Peter, E., Rothbart, M., Oelze, M. L., Shalygo, N., Dietz, K. J. und Grimm, B. (2010).** Mg protoporphyrin monomethylester cyclase deficiency and effects on tetrapyrrole metabolism in different light conditions. *Plant Cell Physiol* 51(7): 1229-1241.
- Peter, E., Salinas, A., Wallner, T., Jeske, D., Dienst, D., Wilde, A. und Grimm, B. (2009).** Differential requirement of two homologous proteins encoded by *sll1214* and *sll1874* for the reaction of Mg protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase under aerobic and micro-oxic growth conditions. *Biochim Biophys Acta* 1787(12): 1458-1467.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. und Dempfle, L. (2002).** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30(9): e36.
- Pfannschmidt, T. (2003).** Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* 8(1): 33-41.
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A. und Allen, J. F. (1999).** Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397(6720): 625-628.
- Pinta, V., Picaud, M., Reiss-Husson, F. und Astier, C. (2002).** Rubrivivax gelatinosus acsF (previously orf358) codes for a conserved, putative binuclear-iron-cluster-containing protein involved in aerobic oxidative cyclization of Mg-protoporphyrin IX monomethylester. *J Bacteriol* 184(3): 746-753.
- Pontoppidan, B. und Kannangara, C. G. (1994).** Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA(Glu) reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis. *Eur J Biochem* 225(2): 529-537.
- Porra, R. J., Schäfer, W., Katheder, I. und Scheer, H. (1995).** The derivation of the oxygen atoms of the 13(1)-oxo and 3-acetyl groups of bacteriochlorophyll a from water in Rhodospirillum rubrum cells adapting from respiratory to photosynthetic conditions: evidence for an anaerobic pathway for the formation of isocyclic ring E. *FEBS Lett* 371(1): 21-24.



- Porra, R. J., Urzinger, M., Winkler, J., Bubenzer, C. und Scheer, H.** (1998). Biosynthesis of the 3-acetyl and 13(1)-oxo groups of bacteriochlorophyll a in the facultative aerobic bacterium, *Rhodovulum sulfidophilum*--the presence of both oxygenase and hydratase pathways for isocyclic ring formation. *Eur J Biochem* 257(1): 185-191.
- Race, H. L., Herrmann, R. G. und Martin, W.** (1999). Why have organelles retained genomes? *Trends in Genetics* 15(9): 364-370.
- Radmer, R. J. und Bogorad, L.** (1967). (Minus) S-adenosyl-L-methionine-magnesium protoporphyrin methyltransferase, an enzyme in the biosynthetic pathway of chlorophyll in *Zea mays*. *Plant Physiol* 42(3): 463-465.
- Rebeiz, C. A., Kolossov, V. L., Briskin, D. und Gawienowski, M.** (2003). Chloroplast Biogenesis: Chlorophyll Biosynthetic Heterogeneity, Multiple Biosynthetic Routes and Biological Spinoffs. Handbook of Photochemistry and Photobiology. N. S. Nalwa (Hrsg.). American Scientific Publisher. Stevenson Ranch, CA (USA), 1: 183-248.
- Richter, A. S., Peter, E., Rothbart, M., Schlicke, H., Toivola, J., Rintamaki, E. und Grimm, B.** (2013). Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. *Plant Physiol* 162(1): 63-73.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. und Stanier, R. Y.** (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111(Mar): 1-61.
- Rocap, G., Larimer, F. W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N. A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W. R., Johnson, Z. I., Land, M., Lindell, D., Post, A. F., Regala, W., Shah, M., Shaw, S. L., Steglich, C., Sullivan, M. B., Ting, C. S., Tolonen, A., Webb, E. A., Zinser, E. R. und Chisholm, S. W.** (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424(6952): 1042-1047.
- Rodermel, S.** (2001). Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci* 6(10): 471-478.
- Roitsch, T. und Sinha, A. K.** (2002). Application of photoautotrophic suspension cultures in plant science. *Photosynthetica* 40(4): 481-492.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C. und Ferrara, P.** (1992). In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* 203(1): 173-179.
- Ruiz, M. T., Voinnet, O. und Baulcombe, D. C.** (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10(6): 937-946.
- Rzeznicka, K., Walker, C. J., Westergren, T., Kannangara, C. G., von Wettstein, D., Merchant, S., Gough, S. P. und Hansson, M.** (2005). *Xantha-l* encodes a membrane subunit of the aerobic Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase involved in chlorophyll biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(16): 5886-5891.

- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (Hrsg.) (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Schlicke, H., Salinas Hartwig, A., Firtzlaff, V., Richter, A. S., Gläßer, C., Mayer, K., Finkemeier, I. und Grimm, B.** (2014). Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signalling. *Mol Plant* 7(7): 1211-1227.
- Schmid, R. und Shemin, D.** (1955). The enzymic formation of porphobilinogen from 5-aminolevulinic acid and its conversion to protoporphyrin. *J Am Chem Soc* 77: 506-508.
- Schmittgen, T. D. und Livak, K. J.** (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nat Protoc* 3(6): 1101-1108.
- Seehra, J. S., Jordan, P. M. und Akhtar, M.** (1983). Anaerobic and aerobic coproporphyrinogen III oxidases of *Rhodospseudomonas spheroides*. Mechanism and stereochemistry of vinyl group formation. *Biochem J* 209(3): 709-718.
- Shalygo, N., Czarnecki, O., Peter, E. und Grimm, B.** (2009). Expression of chlorophyll synthase is also involved in feedback-control of chlorophyll biosynthesis. *Plant Mol Biol* 71(4-5): 425-436.
- Shemin, D. und Russel, C. S.** (1953).  $\delta$ -Aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J Am Chem Soc* 75: 4873-4874.
- Shen, G. und Vermaas, W. F.** (1994). Mutation of chlorophyll ligands in the chlorophyll-binding CP47 protein as studied in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 photosystem I-less background. *Biochemistry* 33(23): 7379-7388.
- Siefermann-Harms, D.** (1987). The Light-Harvesting and Protective Functions of Carotenoids in Photosynthetic Membranes. *Physiologia Plantarum* 69(3): 561-568.
- Sobotka, R., Dühring, U., Komenda, J., Peter, E., Gardian, Z., Tichy, M., Grimm, B. und Wilde, A.** (2008). Importance of the cyanobacterial Gun4 protein for chlorophyll metabolism and assembly of photosynthetic complexes. *J Biol Chem* 283(38): 25794-25802.
- Srivastava, A. und Beale, S. I.** (2005). Glutamyl-tRNA reductase of *Chlorobium vibrioforme* is a dissociable homodimer that contains one tightly bound heme per subunit. *J Bacteriol* 187(13): 4444-4450.
- Stenbaek, A., Hansson, A., Wulff, R. P., Hansson, M., Dietz, K. J. und Jensen, P. E.** (2008). NADPH-dependent thioredoxin reductase and 2-Cys peroxiredoxins are needed for the protection of Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase. *FEBS Lett* 582(18): 2773-2778.

- Stoebe, B. und Kowallik, K. V.** (1999). Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends Genet* 15(9): 344-347.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R. und Chory, J.** (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* 421(6918): 79-83.
- Sugiura, M.** (1992). The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* 19(1): 149-168.
- Sun, Q., Zybaylov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinares, P. D. und van Wijk, K. J.** (2009). PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D969-974.
- Surpin, M., Larkin, R. M. und Chory, J.** (2002). Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell* 14 Suppl: S327-338.
- Susek, R. E., Ausubel, F. M. und Chory, J.** (1993). Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74(5): 787-799.
- Suzuki, J. Y. und Bauer, C. E.** (1992). Light-independent chlorophyll biosynthesis: involvement of the chloroplast gene chlL (frxC). *Plant Cell* 4(8): 929-940.
- Tajima, N., Sato, S., Maruyama, F., Kaneko, T., Sasaki, N. V., Kurokawa, K., Ohta, H., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Tabata, S., Ikeuchi, M. und Sato, N.** (2011). Genomic Structure of the Cyanobacterium Synechocystis sp PCC 6803 Strain GT-S. *DNA Research* 18(5): 393-399.
- Tanaka, R., Kobayashi, K. und Masuda, T.** (2011). Tetrapyrrole Metabolism in Arabidopsis thaliana. *Arabidopsis Book* 9: e0145.
- Tanaka, R., Rothbart, M., Oka, S., Takabayashi, A., Takahashi, K., Shibata, M., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Grimm, B. und Tanaka, A.** (2010). LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(38): 16721-16725.
- Tanaka, R. und Tanaka, A.** (2007). Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 58: 321-346.
- Tanaka, R. und Tanaka, A.** (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochim Biophys Acta* 1807(8): 968-976.
- Tandeau de Marsac, N. und Houmard, J.** (1988). Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra. *Meth Enzymol* 167: 318-328.
- Terry, M. J. und Kendrick, R. E.** (1999). Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and yellow-green-2 mutants of tomato. *Plant Physiol* 119(1): 143-152.

- Terry, M. J. und Smith, A. G.** (2013). A model for tetrapyrrole synthesis as the primary mechanism for plastid-to-nucleus signaling during chloroplast biogenesis. *Front Plant Sci* 4: 14.
- Totter, S., Block, M. A., Allen, M., Westergren, T., Albrieux, C., Scheller, H. V., Merchant, S. und Jensen, P. E.** (2003). Arabidopsis CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26): 16119-16124.
- Tripathy, B. C. und Rebeiz, C. A.** (1988). Chloroplast Biogenesis 60 : Conversion of Divinyl Protochlorophyllide to Monovinyl Protochlorophyllide in Green(ing) Barley, a Dark Monovinyl/Light Divinyl Plant Species. *Plant Physiol* 87(1): 89-94.
- Ulbricht, R.** (Hrsg.) (1920). Das Kugelphotometer (Ulbricht'sche Kugel) : Darstellung seiner Theorie, Ausbildung und Anwendung, unter besonderer Berücksichtigung der Fehlerquellen. Oldenbourg, München u. Berlin.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R. und Kamiya, N.** (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473(7345): 55-60.
- van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. und Stuitje, A. R.** (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2(4): 291-299.
- Vinti, G., Hills, A., Campbell, S., Bowyer, J. R., Mochizuki, N., Chory, J. und Lopez-Juez, E.** (2000). Interactions between hyl1 and gun mutants of Arabidopsis, and their implications for plastid/nuclear signalling. *Plant J* 24(6): 883-894.
- Von Wettstein, D., Gough, S. und Kannangara, C. G.** (1995). Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell* 7(7): 1039-1057.
- Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. und von Wettstein, D.** (1998). Barley glutamyl tRNA<sup>Glu</sup> reductase: mutations affecting haem inhibition and enzyme activity. *Phytochemistry* 47(4): 513-519.
- Wakasugi, T., Nagai, T., Kapoor, M., Sugita, M., Ito, M., Ito, S., Tsudzuki, J., Nakashima, K., Tsudzuki, T., Suzuki, Y., Hamada, A., Ohta, T., Inamura, A., Yoshinaga, K. und Sugiura, M.** (1997). Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11): 5967-5972.
- Walker, C. J., Castelfranco, P. A. und Whyte, B. J.** (1991). Synthesis of divinyl protochlorophyllide. Enzymological properties of the Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester oxidative cyclase system. *Biochem J* 276 ( Pt 3): 691-697.
- Walker, C. J., Mansfield, K. E., Rezzano, I. N., Hanamoto, C. M., Smith, K. M. und Castelfranco, P. A.** (1988). The magnesium-protoporphyrin IX (oxidative) cyclase system. Studies on the mechanism and specificity of the reaction sequence. *Biochem J* 255(2): 685-692.

- Wallar, B. J. und Lipscomb, J. D.** (1996). Dioxygen Activation by Enzymes Containing Binuclear Non-Heme Iron Clusters. *Chem Rev* 96(7): 2625-2658.
- Wallner, T.** (2012). Funktionelle Analyse konservierter Gene aus Cyanobakterien und Chloroplasten: Untersuchungen zur Funktion und physiologischen Relevanz der *Synechocystis* sp. PCC6803-Gene *ycf34*, *ycf54* und *ycf59*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Wallner, T., Hagiwara, Y., Bernat, G., Sobotka, R., Reijerse, E. J., Frankenberg-Dinkel, N. und Wilde, A.** (2012). Inactivation of the conserved open reading frame *ycf34* of *Synechocystis* sp. PCC 6803 interferes with the photosynthetic electron transport chain. *Biochim Biophys Acta* 1817(11): 2016-2026.
- Wang, K.** (Hrsg.) (2006). *Agrobacterium Protocols*. Totowa, New Jersey, *Humana Press*.
- Watanabe, N., Che, F. S., Iwano, M., Takayama, S., Yoshida, S. und Isogai, A.** (2001). Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons. *J Biol Chem* 276(23): 20474-20481.
- Watson, J. M., Fusaro, A. F., Wang, M. und Waterhouse, P. M.** (2005). RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett* 579(26): 5982-5987.
- Weigel, D. und Glazebrook, J.** (Hrsg.) (2002). *Arabidopsis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., USA, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Weinstein, J. D. und Beale, S. I.** (1983). Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* 258(11): 6799-6807.
- Weinstein, J. D., Howell, R. W., Leverette, R. D., Grooms, S. Y., Brignola, P. S., Mayer, S. M. und Beale, S. I.** (1993). Heme Inhibition of [ $\delta$ ]-Aminolevulinic Acid Synthesis Is Enhanced by Glutathione in Cell-Free Extracts of *Chlorella*. *Plant Physiol* 101(2): 657-665.
- Wielopolska, A., Townley, H., Moore, I., Waterhouse, P. und Helliwell, C.** (2005). A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnol J* 3(6): 583-590.
- Wilde, A., Lunser, K., Ossenbuhl, F., Nickelsen, J. und Borner, T.** (2001). Characterization of the cyanobacterial *ycf37*: mutation decreases the photosystem I content. *Biochem J* 357(Pt 1): 211-216.
- Wilde, A., Mikolajczyk, S., Alawady, A., Lokstein, H. und Grimm, B.** (2004). The *gun4* gene is essential for cyanobacterial porphyrin metabolism. *FEBS Lett* 571(1-3): 119-123.
- Willows, R. D.** (2003). Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Nat Prod Rep* 20(3): 327-341.

- Witte, C. P., Noel, L. D., Gielbert, J., Parker, J. E. und Romeis, T.** (2004). Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol Biol* 55(1): 135-147.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51(2): 221-271.
- Wong, Y. S. und Castelfranco, P. A.** (1984). Resolution and Reconstitution of Mg-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester (Oxidative) Cyclase, the Enzyme System Responsible for the Formation of the Chlorophyll Isocyclic Ring. *Plant Physiol* 75(3): 658-661.
- Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M. und Chory, J.** (2011). Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Curr Biol* 21(10): 897-903.
- Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M., Schmitz, R. J., Ecker, J. R. und Chory, J.** (2012). Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression. *Plant J* 73: 1-13.
- Wu, C., Jia, L. und Goggin, F.** (2011). The reliability of virus-induced gene silencing experiments using tobacco rattle virus in tomato is influenced by the size of the vector control. *Mol Plant Pathol* 12(3): 299-305.
- Yamanaka, G. und Glazer, A. N.** (1980). Dynamic aspects of phycobilisome structure. *Arch Microbiol* 124(1): 39-47.
- Yang, Z. M. und Bauer, C. E.** (1990). Rhodobacter capsulatus genes involved in early steps of the bacteriochlorophyll biosynthetic pathway. *J Bacteriol* 172(9): 5001-5010.
- Young, A. J.** (1991). The Photoprotective Role of Carotenoids in Higher-Plants. *Physiol Plant* 83(4): 702-708.
- Yukawa, M., Tsudzuki, T. und Sugiura, M.** (2006). The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Mol Genet Genomics* 275(4): 367-373.
- Zhang, Z. W., Yuan, S., Feng, H., Xu, F., Cheng, J., Shang, J., Zhang, D. W. und Lin, H. H.** (2011). Transient accumulation of Mg-protoporphyrin IX regulates expression of PhANGs - New evidence for the signaling role of tetrapyrroles in mature Arabidopsis plants. *J Plant Physiol* 168(7): 714-721.
- Zheng, C. C., Porat, R., Lu, P. und O'Neill, S. D.** (1998). PNZIP is a novel mesophyll-specific cDNA that is regulated by phytochrome and the circadian rhythm and encodes a protein with a leucine zipper motif. *Plant Physiol* 116(1): 27-35.

## Anhang

### A.1 Alignment von TC41423, TC46832 und TC70459 aus *Nicotiana tabacum*

```

TC41423    MSASTALNLGSLCSSLVNLPTHYSHKPSLLFHGIQSQQFLASPNTVLKGFNGSSRRRWEL  60
TC46832    MLASTALNLGSLGSCIVNVSAHSCHKPSLILQCTQSLPFLALPNTIVKPFNGSSNSSWKL  60
TC70459    MSASTALNLGSLCSSLVNLPTHYSHKPSLLLHGTQSQQFLTLPLNTVLKGFSGS-----  60
          *  *****  *.:**.:.*  .*****:::  **  **:  ***:.*  *.**

TC41423    SRKVKRAVAAVDSSDPAEKQETERKKYYFLVANAKSMLDEEEHFQEQLFERLRLFGERNK  120
TC46832    STPFKTAVAAVDSSEPAEKQETERKKYYFLVANAKFMLDEEEHFQEQLFERLRLFGERNM  120
TC70459    -RNMKSAVAAVDSSDPAEKQETERKKYYFLVANAKFMLDEEEHFQEQLFERLRLFGERDK  120
          . *  *****.:*****  *****:

TC41423    EQDFWLVIIEPKFLDKYPNITKRLKRPVALVSTNGTWITFMKLRLDRVLQESFEADSTEE  120
TC46832    EQDFWLVIIEPKFLDKFPNITKRLKRPVALVSTNGPWITFMKLRLDRVLQESYEADSLEE  120
TC70459    EQDFWLVIIEPKFLDKFPNITKRLKRPVALVSTNGPWITFMKLRLDRVLQESFEADSTEE  120
          *****.:*****.*****.*****:**** **

TC41423    ALACTPVNLEFEKPEKWTAPYPKYESGWWEFPLPPGSHTSKV  222
TC46832    ALACTPVSLKFEKPEKWWAPYPKYESEWWTPLPPGSQTSKV  222
TC70459    ALACTPVNLEFEKPEKWTAPYPKYESGWWEFPLPPGSQTSKV  214
          *****.:*****.***** ** *****:****

```

**Abbildung 44:** Alignment der Aminosäuresequenzen der offenen Leseraster der drei identifizierten TCs (TC41423, TC46832 und TC70459) aus *Nicotiana tabacum* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). (\*) identische Aminosäurereste, (:) konservierte Aminosäuren, (.) semikonservierte Aminosäuren

## A.2 Listen aller verwendeten Primer

**Tabelle 29:** Auflistung von Primern für allgemeine Klonierungen, Sequenzierungen und Test-PCRs. (Fortsetzung auf den nächsten Seiten)

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verwendung	Funktionelle Elemente
<i>ARABIDOPSIS</i>			
attB-CHL27-fw (RNAi)	<u>AAAAAGCAGGCTATACA</u> ACAACCAGACACATTT CGTGAG	Klonierung von <i>Arabidopsis</i> <i>CHL27</i> -RNAi-Konstrukten	<u>Unterstrichen</u> : überlappende attB- Teilsequenz für Gateway-Klonierung
attB-CHL27-rev (RNAi)	<u>TACAAGAAAGCTGGGTAG</u> TATTTTCCTTGCCTTTG TCAGG	Klonierung von <i>Arabidopsis</i> <i>CHL27</i> -RNAi-Konstrukten	<u>Unterstrichen</u> : überlappende attB- Teilsequenz für Gateway-Klonierung
attB-CHLH-RNAi-fw	<u>AAAGCAGGCTATACAC</u> GTGGCGCTGTTCCGCCT	Klonierung von <i>Arabidopsis</i> <i>CHLH</i> -RNAi-Konstrukten	<u>Unterstrichen</u> : überlappende attB- Teilsequenz für Gateway-Klonierung
attB-CHLH-RNAi-rev	<u>CAAGAAAGCTGGGTAT</u> CACCTCCGGGGCCAGGCT	Klonierung von <i>Arabidopsis</i> <i>CHLH</i> -RNAi-Konstrukten	<u>Unterstrichen</u> : überlappende attB- Teilsequenz für Gateway-Klonierung
AtLCAA_ClaI-fw	<u>TATCGATATGT</u> GAGCGTCACCG	Klonierung von AtLCAA zur Überexpression in Pflanzen	<u>Unterstrichen</u> : ClaI-Erkennungssequenz; <b>Fett</b> : Start-Codon
AtLCAA_XmaI-rev	<u>TCCCGGGT</u> ACTGCAGATTCTTGGGTAC	Klonierung von AtLCAA zur Überexpression in Pflanzen	<u>Unterstrichen</u> : XmaI-Erkennungssequenz
AtLCAA oTP_NcoI-fw	<u>ACCATGGATG</u> AGCACCAAGTACCATTTCCT	Klonierung von AtLCAA zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen</u> : NcoI-Erkennungssequenz; <b>Fett</b> : Start-Codon
AtLCAA_SalI-rev	<u>AGTCGACT</u> ACTGCAGATTCTTGGGTACT	Klonierung von AtLCAA zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen</u> : SalI-Erkennungssequenz
AtLCAA oTP_BamHI-fw	<u>AGGATCC</u> AGCACCAAGTACCATTTC	Klonierung von AtLCAA zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen</u> : BamHI-Erkennungssequenz
AtLCAA oTP+Stop_BlpI-rev	<u>CGCTCAGCCT</u> ATACTGCAGATTCTTGGGT	Klonierung von AtLCAA zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen</u> : BlpI-Erkennungssequenz; <b>Fett</b> : Stopp-Codon
pGWB_AtLCAA_fw	CACCAAAATGTGGAGCGTCACCGGAGC	Klonierung und Test-PCRs der Überexpressor-Pflanzen	
pGWB_AtLCAA_rev	CTATACTGCAGATTCTTGGG	Klonierung und Test-PCRs der Überexpressor-Pflanzen	



pGWB_AtLCAA_505R	TACTGCAGATTCTTGGG	Klonierung und Test-PCRs der Überexpressor-Pflanzen	
AtChl27 oTP+ATG_NcoI-fw	<u>ACCATGGG</u> <b>ATG</b> TCAGCCTCTTCCTCA	Klonierung von AtChl27 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen:</u> NcoI-Erkennungssequenz; <b>Fett:</b> Start-Codon
AtChl27 oTP oStop_SalI-rev	<u>CGTCGAC</u> ATAGACAAGATTAGGCTCAAAC	Klonierung von AtChl27 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen:</u> SalI-Erkennungssequenz
AtChl27 oTP_BamHI-fw	<u>AGGATCCG</u> TTTCAGCCTCTTCCTCA	Klonierung von AtChl27 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen:</u> BamHI-Erkennungssequenz
AtChl27 oTP+Stop_SalI-rev	<u>GGTCGAC</u> <b>CTA</b> ATAGACAAGATTAGGCTC	Klonierung von AtChl27 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen:</u> SalI-Erkennungssequenz; <b>Fett:</b> Stopp-Codon
At5g58250-HA-Strep_fw1	GGATGGTGGGATACCTTCTTG	Test-PCRs	
At5g58250-HA-Strep_fw2	GGTGGGATACCTTCTTGCCTA	Test-PCRs	
At5g58250-HA-Strep_rev1	GCCGACAGCATAATCTGGAA	Test-PCRs	

**TABAK**

NsLCAA-fl_SmaI_fw	<u>ACCCGGG</u> <b>ATG</b> TCAGCTTCAACAGCTC	Klonierung von NsLCAA zur Überexpression in Pflanzen	<u>Unterstrichen:</u> SmaI-Erkennungssequenz; <b>Fett:</b> Start-Codon
NsLCAA-fl_SmaI_rev	<u>ACCCCGGG</u> <b>TC</b> ATACCTTTGATGTATGAG	Klonierung von NsLCAA zur Überexpression in Pflanzen	<u>Unterstrichen:</u> SmaI-Erkennungssequenz; <b>Fett:</b> Stopp-Codon
NtLCAA check fw	GCTGTTGATTCTCTGAGCCT	Test-PCRs	
NtLCAA check rev	GGAGTACATGCCAAAGCTTC	Test-PCRs	

**SYNECHOCYSTIS**

slr1780_+ATG_NcoI_fw	<u>CCCATGGG</u> <b>ATG</b> GCTACCTATTATTATGC	Klonierung von slr1780 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen:</u> NcoI-Erkennungssequenz; <b>Fett:</b> Start-Codon
slr1780_oStop_SalI_rev	<u>AGTCGAC</u> ATCCAGGGATGCAAG	Klonierung von slr1780 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen:</u> SalI-Erkennungssequenz
slr1780_oATG_BamHI_fw	<u>CGGATCCG</u> CTACCTATTATTATGCTTTG	Klonierung von slr1780 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen:</u> BamHI-Erkennungssequenz
slr1780_+Stop_SalI_rev	<u>AGTCGAC</u> <b>CTA</b> TCCAGGGATGCAAG	Klonierung von slr1780 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen:</u> SalI-Erkennungssequenz; <b>Fett:</b> Stopp-Codon

sll1214_+ATG_NcoI-fw	ACCATGGATGGTTAATACCCTCGAAAAG	Klonierung von sll1214 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen</u> : NcoI-Erkennungssequenz; <b>Fett</b> : Start-Codon
sll1214_oStop_HindIII-rev	AAAGCTTGCGCACAGCTCCAG	Klonierung von sll1214 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen</u> : HindIII-Erkennungssequenz
sll1214_oATG_BamHI-fw	CGGATCCGTTAATACCCTCGAAAAGC	Klonierung von sll1214 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen</u> : BamHI-Erkennungssequenz
sll1214_+Stop_HindIII-rev	AAAGCTTTTAGCGCACAGCTCCAGC	Klonierung von sll1214 zur Überexpression in <i>E. coli</i>	<u>Unterstrichen</u> : HindIII-Erkennungssequenz; <b>Fett</b> : Stopp-Codon
ycf54-seq-fw	GAAAGTTGGGCATTGACGAC	Test-PCRs	
sll1681-rev	GTGTTTCCCTCAAGTTTGTCGG	Test-PCRs	

**SEQUENZIERUNG**

M13 fw (MM)	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung
M13 rev (MM)	TTCACACAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung
35S-Prom	ATCCTTCGCAAGACCCTTCC	Sequenzierung binäre Vektoren
NOS-Term	TACATGCTTAACGTAATTC AACAG	Sequenzierung binäre Vektoren
pJET1.2_Seq_fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Sequenzierung pJET1.2
pJET1.2_Seq_rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Sequenzierung pJET1.2
pBinAR rev	TTTTTACAACGTGCACAACAGAAT	Sequenzierung
PDK-Intron_3-fw	TCTTCTTCGTCTTACACATCACTTG	Sequenzierung von pOpOff2(hyg)-Konstrukten
CAT-Intron_5-rev	AATTGGGTTCGAAATCGATAAGC	Sequenzierung von pOpOff2(hyg)-Konstrukten

**SONSTIGES**

Oligo-dT (18)	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA-Synthese
attB fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATACA	Klonierung von Gateway-Konstrukten
attB rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA	Klonierung von Gateway-Konstrukten

RB_pGWB_fw	GTTTACCCGCCAATATATCCTG	Test-PCRs
LB_pGWB_rev	TGGCAGGATATATTGTGGTGTAAC	Test-PCRs
AGRI-51 fw	CAACCACGTCTTCAAAGCAA	Test-PCRs, Sequenzierungen
AGRI-56 fw	CTGGGGTACCGAATTCCTC	Test-PCRs, Sequenzierungen
AGRI-64 rev	CTTGCGCTGCAGTTATCATC	Test-PCRs, Sequenzierungen
AGRI-69 fw	AGGCGTCTCGCATATCTCAT	Test-PCRs, Sequenzierungen
hyg_fw1	AGATCGTTATGTTTATCGGCAC	Test-PCRs
hyg_rev1	CGCCATGTAGTGTATTGACC	Test-PCRs
HA-Strep_fw1	GATGTTCCAGATTATGCTGTCG	Test-PCRs
HA-Strep_rev1	TTCAAATTGAGGATGAGACCAA	Test-PCRs
HA-Strep_fw2	CGATGTTCCAGATTATGCTGTC	Test-PCRs
HA-Strep_rev2	TTTCAAATTGAGGATGAGACCA	Test-PCRs

**Tabelle 30:** Auflistung der verwendeten qPCR-Primerpaare. Als Annealing-Temperatur für die PCRs wurde in der Regel 60°C gewählt. Die zu erwartenden PCR-Produkte weisen eine Länge von 50 - 150 Nukleotiden auf. (Fortsetzung auf den nächsten Seiten)

Bezeichnung	fw-Primer-Sequenz 5' → 3'	rev-Primer-Sequenz 5' → 3'
<i>ARABIDOPSIS</i>		
qPCR_At_CAO	AAAGGCTGGAGTGTCCTCAAGT	ATCCTTGGAGACCCGAGGTAG
qPCR_At_CHLD	GGGAAGATATACAAGGCAGGG	GAGATTACAGCATCCGAAGCA
qPCR_At_CHLH	CTGGTCGTGACCCTAGAACAG	GATTGCCAGCTTCTTCTCTG
qPCR_At_CHLM	TTGCTGAAGCTGAGATGAAGGCAAAG	CAACGGTATCATACTTCCCAGTTAGG
qPCR_At_FC1	AGCCGTTCCAGTCAGTTTCGT	CTCCATGTCTATCTCTCAAGTGTCT
qPCR_At_GUN4	TTAGGACACTTACCGCTCAC	GCTCGTCTTCTGTTTCTCCA
qPCR_At_HEMA1	TTGCTGCCAACAAGAAGAC	CCGTCTCCAATGAATCCCTC
qPCR_At_LHCB1.2	TCATTTGGCTGATCCTGTGG	GTACATTCACGACTTTACAAAGCAG
qPCR_At_PORB	TGATTACCCTTCAAAGCGTCTCA	CAATGTATTCTGTGTTCCCGGT

qPCR_At_Ref_ACT2	CTTCCCTCAGCACATTCCAG	GACCTGCCTCATCATACTCG	
qPCR_At_Ref_TUB6	TCAGAGTACCAGCAATACCA	CAATATCTCTTCTTCATCCTCGTC	
<b>TABAK</b>			Homologes Gen in <i>Arabidopsis</i>
qPCR_Nt_APX	CTAAACTGAGCAACCTTGGAGCC	CTCTGGCTGACCTTGTGTAGGAG	AT1G77490/AT4G08390
qPCR_Nt_ATPD	ACGCTTACGGACACGGAACCTTG	TCGCGATCTGAGCCAAATGCTG	AT4G09650
qPCR_Nt_CHL27	AGCACAGCCTCAGTTCCTCAATG	AAGGCAGAAGAAGCGAGACCAC	AT3G56940
qPCR_Nt_CHLD	AAGCTTCTGATGCACCCAGACC	AGCCACCTCGAGAATCTCATCC	AT1G08520
qPCR_Nt_CHLG	GCTCAAACAGAATGGATGGATTGG	CCGGCAACGCTATACAAGAGTG	AT3G51820
qPCR_Nt_CHLH	CCTCAGGAAAGACGGGAAGAAG	AGCCTCACAGTCTCAGACAACG	AT5G13630
qPCR_Nt_CHLI	GTCCGTGACAAATTGAGGAGCGG	TGCCACACACCCTGTCCTCAG	AT4G18480/AT5G45930
qPCR_Nt_CHLM	GAAGGACTTGAGAGTTTGGATGG	CAGCCAATGACGCAAGATGAGC	AT4G25080
qPCR_Nt_DVR	GGTAAGTACAGTCCCTTATGCAATTC	GGGCTTTCAATAGTAGAGGCAGC	AT5G18660
qPCR_Nt_FSD1	CTTGCCTTGGTGAAAACCTCCTAACG	GAAAGTCCAGATAGTAGGCATGCTC	AT4G25100
qPCR_Nt_GluTS1	TGGCTGGTCTTCCAGCATTAGTTC	AGCCTTGCAAGTGTCTGCTCAAAG	AT3G25660
qPCR_Nt_GluTS2	TGTCTGCTGGTGCTGTAACCTCG	GCGGAGACAGAAGGCATAAGATCG	AT5G64050
qPCR_Nt_GSA	ATGTGTGGCGGGTACATAAGGG	TACACCTTCCTCCAGCATTCCC	AT5G63570/AT3G48730
qPCR_Nt_GUN4	CAAGCTGACGAGGAAACTCGGC	CTTCAGAGAAGAAAACATAGCCTCG	AT3G59400
qPCR_Nt_HEMA	ACAGCCGCACATTGAGTGAGAC	TTTGAGTTTGCTCCACTTTAGCTCG	AT1G58290
qPCR_Nt_HEMB	ATGGGCATGATGGCATTGTGAG	ACAACATCTGCTCCTGCTCTGG	AT1G69740
qPCR_Nt_HEMC	CCTTGCTGAAGAGGGAGCCATT	CCAATGTCTGCAAGAGGCTGACT	AT5G08280
qPCR_Nt_HEMD	TACCTGATCTAGGCAGGCTCAC	TCCCGCCTCTGGTGAAGTAATG	AT2G26540
qPCR_Nt_HEME1	GGGTCATATCCTCAATCTTGGCC	CAACAAGGCTTCCACAGTCTGC	AT3G14930
qPCR_Nt_HEME2	AGGGGAAGGGTCTGTGATATTT	TGCTTGATTATTGACCTCTTTCCGC	AT2G40490
qPCR_Nt_HEMF	CCCACTGATAATGGAAATGTCAAGC	CCTTGGTGCTCCTGGTGCATC	AT1G03475
qPCR_Nt_LCAA	ACATGGAGCAGGATTTCTGG	AACGGGAGTACATGCCAAAG	AT5G58250
qPCR_Nt_LHCA1	TAGCCATTGCTTTTGTAGAGCACC	GAGTAGCCCAATGGGTCAAAAGC	AT3G54890
qPCR_Nt_LHCA6	GGAGATCAAGAATGGTCGACTCGC	TGTCCAGGATCAGCAAGATGTGAC	AT1G19150
qPCR_Nt_LHCB2	GTAAATTCGGTGAGGCAGTTTGG	AGGTAGTCAAGACCGCCTTCTG	AT3G27690

qPCR_Nt_LHCB3	TGGTTCAAAGCAGGAGCTCAAATC	GCATGCACAAGGTTAGGGTTGC	AT5G54270
qPCR_Nt_LHCB6	TGCACCTTTCTCTTTTGGCTCACT	CCTTTTGTCTCTCAACCCACCCC	AT1G15820
qPCR_Nt_NOL	TACAATTCACTTCCTTTCTGTGCTGC	ATAACCTATTTCCTTTGGAACCACTG	AT5G04900
qPCR_Nt_PETC	ATTTGCCCCGTGCCATGGATCTC	TGGGACAAACACCACCTTCCCA	AT4G03280
qPCR_Nt_PORAB	CTCCTTTTCCCTCCATTCCAGAAG	AGGCTTGGATCACTTACAACCTG	AT5G54190/AT4G27440
qPCR_Nt_PORC	GGTCGTACGTGATCCAAGCCTTTC	AACGAGGAGGAGGTGTTGTTCC	AT1G03630
qPCR_Nt_PPO1	GATCGTGCCGGTGGCAACATAAC	CATCCTTCAATCCACAATCTACTGC	AT4G01690
qPCR_Nt_PPO2	GCAATTTTCTTTCCACTGGATCAAAGC	GGTCAATTAGATAGTCAACAACCTCC	AT5G14220
qPCR_Nt_PSAD1	GGACCCAAGCACCCCATCTC	TGAGCAAATTTGGGCCTTCTCTC	AT4G02770
qPCR_Nt_PSAD2	GCGAGGAAAGAGCAGTGTTTAGC	CTTGACGGCCAGCGTTCACC	AT1G03130
qPCR_Nt_PSO1	TCAAACAGCTCGTGGCATCTGG	CCCTTCCCTTTGGGTCAAGGAATG	AT5G66570
qPCR_Nt_PSO2	AAACAGCTAGTGGCAAGCGGC	CAATGCAACAGCGTTGTCATAGCC	AT3G50820
qPCR_Nt_Ref1	AATCGAGTGTGTCAGTGGATCAAG	CACCATGAGAAAGGACTCGCTC	AT2G28390
qPCR_Nt_Ref2	TGGACTAGGCCACCAATTCAGATG	GAGGAAACGTACTCGCAATCCAG	AT5G46630
qPCR_Nt_Ref3	CGCCCTTCCTCATGCAAT	TTAACATCGCGGACAATTTCC	Actin
qPCR_Nt_Ref4	GACCAGATTAATGAGCCCAAGAG	GACACCAGTTTCCACACGAC	AT1G07920

***SYNECHOCYSTIS***

Gen-Annotation

qPCR_Syn-apcA	AGTGGGCGTACGGGAAATGT	GGCATCATCGGAGGACATCA	slr2067
qPCR_Syn-cpcA	CGGAGGTAGTAGCCGATGTC	GCCCAAGCCGTTTATAACAA	sll1578
qPCR_Syn-cycI	GGTGTCGTTTCTTCCTGCTC	CGCCCGTAGTTGTTTCGTTAT	sll1214
qPCR_Syn-cycII	GAAAAGAATCCCGACCACAA	GATAAAAATCCGTCCGCTCA	sll1874
qPCR_Syn-pdxJ	AAATTGCCCTCAACCTTAAACC	ATATGTCGGGATTGTAAGTCT	slr1779
qPCR_Syn-psaA	CCTTCGAGAAGTGGGGCAAGCCGGG	CCACAGCGAGGTGCCCAAAGTGAGC	slr1834
qPCR_Syn-psbA2	CACCGCCGTATTCTTGATCT	GATGTTGTGCTCAGCTTGGA	slr1311
qPCR_Syn-Ref_lysC	CAATTATGGCATTCCCTTG	TTGGCAATTTCAAGCCCTAC	slr0657
qPCR_Syn-Ref_trpA	CCAGTTCCCCAGAAAGACAA	TTAACCATGGCGCTTCCTAC	slr0966
qPCR_Syn-ycf54	ACCCTTTGAAGAGGTGCTGA	CAACCGGAGTTTACCCAAA	slr1780

**Tabelle 31:** Auflistung von Primerpaaren für die semi-quantitative Transkriptanalyse von *Arabidopsis*-Genen. Als Annealing-Temperatur für die PCRs wurde in der Regel 58°C gewählt. Die zu erwartenden PCR-Produkte weisen eine Länge von 300 - 400 Nukleotiden auf.

Bezeichnung	Fw-Primer Sequenz 5' → 3'	Rev-Primer Sequenz 5' → 3'
SQ_At_APX1		
SQ_At_CAO	GATAAACCCCTCCTCTTCAACC	CATCTTCTTACATTCTCCATCGG
SQ_At_CHLH	GCAGGTTCTTTGGATGATTGG	CTGATGTTGGCTGAGTATGAC
SQ_At_CHL27	TACATCACAATCTACAGACACCTC	TCACAACCATTCTATCCAGTTTCC
SQ_At_FC1	AGCCGTTCCAGTCAGTTTCGT	ACATCTTGACAATGTAAGTAAAGCATCT
SQ_At_GSA1	TTTACGCCAGCTTACTAAAGAC	ATACTCATATGTTCCCTGCCTG
SQ_At_GUN4	ACTTCTCTTTCCCTCAAACAACC	GCTGTATCCGAATCTACCATCAC
SQ_At_HEMA1	CATCTCTGCTCTTGAACAACCTC	GTTGACAAATCTCTGAAACTGGG
SQ_At_HEMG1	AGTTATCTCTTCTCCGTCCGA	ATCTCCCAACACCAAATCATCC
SQ_At_LHCB1.2	GTGAACTAGAAGTTATCCACAGCA	CAGCAAGGTTCTCTATCGGT
SQ_At_PORB	CTTCTTTGGTCTCCTCTGCT	ATTATCACGTTCCATTTCCCTG
SQ_At_Ref_TUA5	TGGTTCTGGATTGGGTTCTC	ACAGCATGAAATGGATACGG

## Publikationsliste

- Schlicke, H., Salinas Hartwig, A., Firtzlaff, V., Richter, A. S., Gläßer, C., Mayer, K., Finkemeier, I. und Grimm, B. (2014). Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signalling. *Mol Plant*.
- Salinas, A. und Grimm, B. (2014). The Mg Branch of Tetrapyrrole Biosynthesis: From Magnesium Protoporphyrin IX to Chlorophyll *a/b*. Handbook of Porphyrin Science. Volume 28, Chorophyll, Photosynthesis and Bio-inspired Energy.
- Albus, C. A., Salinas, A., Czarnecki, O., Kahlau, S., Rothbart, M., Thiele, W., Lein, W., Bock, R., Grimm, B. und Schöttler, M. A. (2012). LCAA, a novel factor required for magnesium protoporphyrin monomethylester cyclase accumulation and feedback control of aminolevulinic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 160(4): 1923-1939.
- Peter, E., Salinas, A., Wallner, T., Jeske, D., Dienst, D., Wilde, A. und Grimm, B. (2009). Differential requirement of two homologous proteins encoded by *sll1214* and *sll1874* for the reaction of Mg protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase under aerobic and micro-oxic growth conditions. *Biochim Biophys Acta* 1787(12): 1458-1467.
- Weihe, A., Apitz, J., Pohlheim, F., Salinas-Hartwig, A. und Börner, T. (2009). Biparental inheritance of plastidial and mitochondrial DNA and hybrid variegation in *Pelargonium*. *Mol Genet Genomics* 282(6): 587-93.

## Konferenzbeiträge

- Salinas, A. und Grimm, B. YCF54 – a new factor involved in chlorophyll metabolism, in particular the oxidative Mg protoporphyrin IX monomethylester cyclase reaction. Vortrag beim *Havel-Spree-Colloquium* in Potsdam (Deutschland), 07.12.2012.
- Salinas, A. und Grimm, B. YCF54 – a new factor involved in chlorophyll metabolism, in particular the oxidative Mg protoporphyrin IX monomethylester cyclase reaction. Vortrag beim 29. *Wallenfels Rundgespräch zur Pflanzenbiochemie* in Wallenfels (Deutschland), 11.-13.05.2012.
- Salinas Hartwig, A., Richter, A., Roitsch, Th. und Grimm, B. Photoautotrophic *Arabidopsis* cell suspension culture for analysis of tetrapyrrole-mediated retrograde signaling. Posterbeitrag bei der *Botanikertagung*, Berlin (Deutschland), 18.-23.09.2011.

**Salinas, Hartwig, A., Richter, A., Roitsch, Th. und Grimm, B.** Photoautotrophic *Arabidopsis* cell suspension culture for analysis of tetrapyrrole-mediated retrograde signaling. Posterbeitrag beim 1<sup>st</sup> FEBS workshop - *Plant Organellar Signaling "From algae to higher plants"*, Primošten (Kroatien), 31.08.-03.09.2011.

**Salinas, A., Peter, E., Rothbart, M., Jeske, D., Wallner, T., Wilde, A. und Grimm, B.** (2009). Comparative Analysis of the Physiological Effects of Deficient Mg-Protoporphyrin IX Monomethylester Oxidative Cyclase in Tobacco and *Synechocystis*. Posterbeitrag beim 4<sup>th</sup> *International Symposium of the SFB 429 – Signals, Sensing and Plant Primary Metabolism*, Berlin (Deutschland), 06.-09.10.2010.

**Salinas, A., Schlicke, H. und Grimm, B.** (2009). Exploring Signals Derived from the tetrapyrrole Biosynthetic pathway. Posterbeitrag bei der 1<sup>st</sup> *International Conference on Retrograde Signalling in Plants*, Berlin (Deutschland), 01.-03.10.2009.

**Salinas, A., Peter, E., Rothbart, M., Jeske, D., Wallner, T., Wilde, A. und Grimm, B.** (2009). Comparative Analysis of the Physiological Effects of Deficient Mg-Protoporphyrin IX Monomethylester Oxidative Cyclase in Tobacco and *Synechocystis*. Posterbeitrag beim *Leopoldina-Symposium "Molecular Genetics of Chloroplasts and Mitochondria"*, Berlin (Deutschland), 20.-23.09.2009.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in den letzten Jahren auf meinem Weg begleitet haben und durch ihre tatkräftige Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation wesentlich beitrugen.

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Bernhard Grimm für die Möglichkeit danken, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Biologie anfertigen zu dürfen, sowie für seine Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen, wertvollen Ratschläge und Anmerkungen. Er ermöglichte mir den einen oder anderen Forschungsaufenthalt in auswärtigen Laboren sowie mit anderen Gruppen zusammen zu arbeiten.

Damit verbunden gilt mein besonderer Dank allen Kooperationspartnern, ohne die diese Arbeit nicht möglich wäre. Ich danke Prof. Dr. Annegret Wilde und Thomas für die gute Zusammenarbeit bei den gemeinsamen Arbeiten mit den Cyanobakterien. Ein großer Dank gilt der Forschergruppe FOR804 sowie Dr. Christin Albus und Dr. Mark A. Schöttler für die theoretische und praktische Hilfe bei den Untersuchungen zu retrograden Signalen und den Tabak-Antisense-Pflanzen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei den Hallenser und Bochumer Teams für die Ausführungen der massenspektrometrischen Analysen.

Besonders möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Pflanzenphysiologie für das ausgesprochen gute Arbeitsklima, die zahlreichen vergnüglichen Stunden und die große Hilfsbereitschaft bedanken. Ein großer Dank gebührt vor allem Barbara Hickel und Heidemarie Schneider für ihre technische Assistenz bei den HPLC-Analysen, sowie Aleksandra Hackel, die mich in vielen Experimenten tatkräftig unterstützt hat. Besonders hervorheben möchte ich Hagen Schlicke, der jederzeit ein offenes Ohr hatte und durch seine Anregungen sowie die interessanten Diskussionen meine Arbeit entscheidend bereicherte. Für die vielen lustigen Momente während des Laboralltags danke ich ihm und natürlich den Laborhühnern. Einen entscheidenden Beitrag zu meiner Arbeit haben auch „meine“ Studentinnen Madlen und Josephine geleistet, denen ich hier herzlich danke.

Nicht zuletzt geht ein ganz besonderes Dankeschön an meine Familie und meine Freunde, die mich stets unterstützt und motiviert haben und diese Arbeit mit Anteilnahme verfolgten. Vor allem danke ich meinem Mann für seine andauernde Ermutigung, ohne dessen Liebe, Vertrauen und Rückhalt meine Dissertation nicht zu dem geworden wäre, was sie nun ist.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nach §7, Absatz 3 der Promotionsordnung vom 06. Juli 2009 der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin verwendet habe. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift keiner anderen Prüfungsbehörde im In- oder Ausland in dieser oder ähnlicher Form vorgelegt wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift